HERSTELLUNG UND FUNKTIONSTESTUNG VON HÄMOGLOBIN-LIPOSOMEN ALS SAUERSTOFFÜBERTRÄGER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HANSWERNER JARONI
aus Schwäbisch-Gmünd

1984

HERSTELLUNG UND FUNKTIONSTESTUNG VON HÄMOGLOBIN-LIPOSOMEN ALS SAUERSTOFFÜBERTRÄGER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HANSWERNER JARONI
aus Schwäbisch-Gmünd

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 3. August 1984
Dekan: Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter: PD Dr. K.-P. Hartter
2. Berichterstatter: PD Dr. Dr. K.H. Schmidt

Die vorliegende Arbeit wurde in den Forschungslaboratorien der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen (Direktor Prof.Dr. Leo Koslowski) durchgeführt.

Herrn PD Dr.Dr. Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die ständige Bereitschaft zu kritischen Diskussionen.

Herrn PD Dr. Hartter danke ich für die fachgerechte Beratung bei der Arbeit.

Herrn Prof.Dr. Schlote und Herrn PD Dr. Wolburg danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Meinen Mitstreitern im Labor danke ich für die kooperative und kollegiale Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Schubert, der mich durch seine wertvollen Anregungen und Detailkenntnisse in meiner Arbeit sehr unterstützt hat.

Herrn Prof.Dr. Kosłowski danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

ABKÜRZUNGEN

Akt.	Aktivität
AS	Aminosäure
2,3-DPG	Diphosphoglycerat
EM	Elektronenmikroskopie
Ery	Erythrocyt
FFAP	free fatty assay for low tailing polar compounds
Frkt.	Fraktion
FS	Fettsäure
GFL	ghost free lysat
GP	Glukopyranosid
Hb	Hämoglobin
HBSS	Hanks balanced salt solution
HWZ	Halbwertszeit
Lipos	Liposomen
Lsg.	Lösung
Lys.	Lysat
mM	millimolar
MetHb	Methämoglobin
N	Normalität
n.D.	nach Dialyse
ODC	Oxygen dissociation curve
ORC	Oxygen release capacity
P50-Wert	Sauerstoffpartialdruck bei 50% Sättigung
RES	Retikuloendotheliales System
RT	Raumtemperatur
SFH	Stroma freies Hämoglobin
UZ	Ultrazentrifuge
VB	Vollblut
v.D.	vor Dialyse

I N H A L T

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Blutkonserven	1
1.2.	Perfluorocarbone	2
1.3.	Hämoglobin-Lösungen	3
1.4.	Synthetische Chelate	7
1.5.	Liposomen	7
2.	PROBLEMSTELLUNG	10
3.	MATERIAL	12
3.1.	Versuchstiere	12
3.2.	Lösungen, Medien	12
3.3.	Chemikalien	13
3.4.	Geräte	15
4.	METHODEN	17
4.1.	Photometrische Messungen	17
4.1.1.	Lowry-Proteinbestimmung	17
4.1.2.	Phosphatbestimmung nach Bartlett	19
4.1.3.	Hämoglobin-Cyan-Methode	20
4.2.	Isoelektrische Fokussierung	21
4.3.	Gaschromatographische Untersuchungen	23
4.4.	S-Wert-Bestimmungen mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge	24
4.5.	Säulenchromatographische Untersuchungen	25
4.6.	Berechnungen zur Radioaktivität doppelt markierter Proben mit Quenchkorrektur	25
4.7.	Hämoglobin, Isolierung und Charakterisierung	28
4.7.1.	Hämoglobin-Lösung	28
4.7.2.	Spektrophotometrie	29
4.7.3.	Emulgator-Inkubationen	31
4.7.4.	Lagerstabilität	31

4.8.	Liposomen, Präparation und Charakterisierung	32
4.8.1.	Präparationsmethoden	32
4.8.1.1.	Handshaken/Ultraschall	33
4.8.1.2.	Gelfiltration	33
4.8.1.3.	Ätherinjektion	34
4.8.1.4.	Kontrollierte Durchfluß-Dialyse	34
4.8.2.	Charakterisierung	38
4.8.2.2.	Nanosizer	38
4.8.2.3.	Elektronenmikroskopie	39
4.8.2.4.	Struktur-Berechnungen	39
4.8.2.5.	Sauerstoff-Dissoziationskurven	40
4.8.3.	Lagerstabilität	43
4.8.4.	Wechselwirkungen mit Heparin	43
4.9.	in vitro und in vivo Versuche	44
4.9.1.	Ultrazentrifugenmethode	44
4.9.2.	Leberperfusionen	45
4.9.3.	Biolumat-Tests	48
4.9.4.	Immunologische Tests	52
4.9.5.	Plasmaeliminationen	53
4.9.6.	Organaufnahme	53
5.	RESULTATE	55
5.1.	Charakterisierung des Hämoglobins nach Isolierung	55
5.1.1.	Isoelektrische Fokussierung	55
5.1.2.	Gaschromatographie	56
5.1.3.	S-Wert-Bestimmungen	56
5.1.4.	Säulenchromatographie	56
5.1.5.	Sauerstoff-Dissoziationskurven	56
5.1.6.	Spektrophotometrie	56
5.1.7.	Lagerstabilität	58
5.1.8.	Emulgator-Inkubationen	58
5.2.	Hämoglobin-Liposomen	58
5.2.1.	Ergebnisse der verschiedenen Präparationsmethoden	61
5.2.2.	Cholesterin-Einbau in die Liposomenmembran	66
5.2.3.	Größe und Struktur der Hämoglobin-Liposomen	67
5.2.4.	S-Wert-Bestimmungen vor und nach Ultrazentrifugation	72
5.2.5.	Sauerstoff-Dissoziationskurven	73
5.2.6.	Tocopherol- und 2,3-DPG-Einbau in Liposomen	73
5.2.7.	Lagerstabilität	77
5.2.8.	Wechselwirkungen mit Heparin	77
5.3.	in vitro Versuche	79

5.3.1. Ultrazentrifugenmethode 79
5.3.2. Leberperfusionen 80
5.3.3. Biolumat-Tests 84

5.4. in vivo Versuche 85
5.4.1. Immunologische Tests 85
5.4.2. Plasmaelimination und Organaufnahme 85

6. DISKUSSION 88

7. ZUSAMMENFASSUNG 99

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. BLUTKONSERVEN

Obwohl im Jahre 1817 James Blundel, ein englischer Geburtshelfer und Physiologe, die erste Bluttransfusion von Mensch zu Mensch durchführte, sollte der Medizin erst Mitte des 20.Jahrhunderts mit der Errichtung sogenannter Blutbanken der eigentliche Durchbruch in eine heute etablierte Fachrichtung, der Transfusionsmedizin, gelingen. Seither ist die Übertragung von Blut und seinen Bestandteilen ein längst bewährtes therapeutisches Verfahren zur Behandlung von Blutverlusten unterschiedlichster Ursachen.
Die breite Anwendung von Blutkonserven in der Transfusionsmedizin macht aber eine aufwendige Lagerung und Konservierung von Blut bzw. Blutbestandteilen notwendig. Die Haltbarkeit einer Blutkonserve ist auf maximal 35 Tage begrenzt. Während der Lagerung treten biochemische und physikalische Veränderungen im Blut auf. Die Bildung von Mikroaggregaten, das Ansteigen der Sauerstoff-Affinität des Hämoglobins und die dadurch bedingte Unterversorgung stoffwechselaktiver Organe mit Sauerstoff sind unerwünschte Erscheinungen, die bei einer Bluttransfusion problematisch werden können. Auch die Notwendigkeit einer vorherigen Typisierung des Blutes im ABO- und Rhesussystem neben einer Kompatibilitätsüberprüfung schränken den Einsatz von Konserven in vielen Situationen ein.

Schließlich muß als gravierend angesehen werden, daß die Krankheitsübertragung durch Konservenblut niemals völlig ausgeschlossen werden kann. Die Hepatitisübertragung und die Berichte über das AID-Syndrom (Aquired Immuno Deficiency Syndrom) nach Bluttransfusionen führen diese Gefahr eindringlich vor Augen.
Der Ersatz von Blut durch Plasmaexpander wie Albumin-Lösungen, Hydroxyäthylstärke, Dextrane, kolloidfreie Salzlösungen u.a. zeigt bis zu einem gewissen Grade Erfolge, ist aber dann nicht ausreichend, wenn auch die verlorengegangene Sauerstoff-Transportkapazität zur Versorgung der Gewebe wiederhergestellt werden muß. Dies ist bei einem Blutverlust von ca. 1,3 l (25% Blutvolumen) der Fall.
Verfolgt man die Bemühungen um die Entwicklung eines geeigneten Sauerstoff übertragenden Blutersatzstoffes in den vergangenen Jahren, so treten hauptsächlich zwei Forschungsrichtungen in den Vordergrund : einmal versucht man die Herstellung von Verbindungen, die den Sauerstoff in ausreichender Menge physikalisch lösen (z.B. Perfluorocarbone), und zum anderen experimentiert man mit solchen Stoffen, die das Gas in chemisch gebundener Form transportieren (z.B. Hämoglobinlösungen).

1.2. PERFLUOROCARBONE

Die seit Jahren in der Fachpresse viel beschriebenen sogenannten Perfluorocarbone (Handelsname:Fluosole) sind die wichtigsten Vertreter der ersten Klasse (NAITO 1978).
Es sind synthetisch gewonnene, wasserunlösliche Verbindungen aus

Kohlenwasserstoffen und Fluor, die die Eigenschaft besitzen, Gase wie O_2, CO_2, CO, N_2 u.a. in Flüssigkeiten physikalisch zu lösen. Für die Anwendung müssen sie emulgiert werden, wobei die Emulsionen keinesfalls bioinert sind, sondern im retikuloendothelialen Gewebe der Lunge, der Leber und anderer Organe gespeichert werden. Ein weiterer Nachteil der Fluosole liegt in der linearen Beziehung zwischen Sauerstoffpartialdruck und gebundener Menge O_2 in Vol.%. Während Blut mit einem HK-Wert von 15% bei einem arteriellen pO_2 von 100mmHg noch etwa 6 Vol.% O_2 bindet, benötigt man z.B. für die Bindung von 7 Vol.% O_2 an Fluosol-DA einen pO_2 von 600mmHg. Um den Carrier zu sättigen, müßte eine reine Sauerstoffbeatmung durchgeführt werden. Unter Umständen reicht der bei diesem hohen Partialdruck gelöste Sauerstoff im Serum aus, um den Organismus kurzfristig vor akutem Sauerstoffmangel zu schützen. Zweifelhaft bleibt deshalb, trotz erfolgter klinischer Anwendung, die Effektivität der Fluosole auf die Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff (LUNDSGAARD-HANSEN 1980).
So haben sich denn auch Experten im Ausschuß für Blutprodukte der amerikanischen Nahrungs-und Arzneimittelbehörde FDA (Food and Drug Administration) dagegen ausgesprochen, die von dem japanischen Unternehmen Green Cross Corporation entwickelten Perfluorocarbone klinisch anzuwenden (FAZ 1984).

1.3. HÄMOGLOBIN-LÖSUNGEN

Zur zweiten Kategorie der Sauerstoff übertragenden Blutersatzstoffe gehören die in zahlreichen Arbeitsgruppen entwickelten Präparate auf

der Basis von Hämoglobin (Hb).

Als lebenswichtiges Protein transportiert Hämoglobin den Sauerstoff aus der Lunge in die Gewebe und ermöglicht den Rücktransport von CO_2 aus den Geweben zur Lunge.

Ein Hb-Molekül besteht aus vier als Globine bezeichneten Polypeptidketten, zwei α-Ketten zu je 141 Aminosäuren (AS) und zwei ß-Ketten zu je 146 Aminosäuren. Die α- und ß-Ketten haben verschiedene AS-Sequenzen, falten sich aber dennoch zu ähnlichen dreidimensionalen Strukturen.

Jede Kette beherbergt eine Häm-Gruppe, die dem Blut seine rote Farbe verleiht. Die Häm-Gruppe ist das aktive Zentrum (prostetische Gruppe) des Hb-Moleküls und die Bindungsstelle für den Sauerstoff. Sie besteht aus einem Porphyrinring, in dessen Mitte ein zweiwertiges Eisenatom kovalent gebunden ist.

Zusammen mit ihrer Häm-Gruppe stellt jede der Polypeptidketten eine Untereinheit oder ein Monomer des Hämoglobins dar. Das vollständige Hb-Molekül besteht aus vier Untereinheiten, zwei α- und zwei ß-Ketten, die sich über Wasserstoffbrücken zu einem Tetramer formieren.

Bedingt durch die Wechselwirkungen unter den einzelnen Häm-Gruppen eines Hb-Moleküls verläuft die Sauerstoff-Dissoziationskurve des Hämoglobins sigmoid, d.h. die Affinität des Moleküls zu Sauerstoff steigt mit zunehmender O_2-Aufnahme bis zu einem bestimmten Sättigungsbereich an.

Die Neigung der Tangente im Wendepunkt der Kurve bestimmt den Hill-Koeffizienten. Er wurde nach dem englischen Physiologen A.V.Hill benannt, der als erster eine mathematische Analyse des

O2-Gleichgewichtes versuchte. Der theoretische Wert des Hill-Koeffizienten liegt bei 3. Ohne die Häm-Häm-Wechselwirkung hat er den Wert 1.

Im Erythrocyten hängen der Hill-Koeffizient und die Affinität des Hämoglobins zu Sauerstoff von der Konzentration mehrerer Substanzen ab : H^+-Ionen bzw. pH-Wert und CO_2 (Bohr-Effekt), Cl^--Ionen und 2,3-Diphosphoglycerat.

Steigt die Konzentration eines dieser Stoffe an, so verschiebt sich die O_2-Dissoziationskurve nach rechts, d.h. zu niedrigeren O_2-Affinitäten, und der sigmoide Kurvenverlauf verstärkt sich. Auch ein Temperatur-Anstieg verschiebt die Kurve nach rechts, schwächt aber die Sigmoidität ab.

Die Häm-Häm-Wechselwirkungen und das Zusammenspiel zwischen O_2, CO_2, pH-Wert, Cl^--Ionen und 2,3-DPG faßt man als kooperative Effekte zusammen. Alle kooperativen Effekte verschwinden, wenn das Hb-Molekül nur halbiert wird.

Auf der Außenseite des Hb-Moleküls befinden sich überwiegend elektrisch geladene und dipolbildende Seitenketten, die das Molekül wasserlöslich machen.

Das Konzept, Hb-Lösungen als Blutersatz zu verwenden, wurde schon 1934 von AMBERSON (1934) beschrieben, aber die erwiesene renale Toxizität dieser Hb-Lösungen verhinderte die Weiterentwicklung zu einem Ersatzstoff. Erst als man erkannte, daß für die Nephrotoxizität der Hb-Lösungen die Verunreinigung durch das Stroma der Erythrocyten verantwortlich war (RABINER 1967), konnte an eine Fortführung der Experimente gedacht werden (DE VENUTO 1977, SAVITSKI 1978, DE VENUTO 1982).

Bei den aus Erythrocyten-Hämolysaten gewonnenen stromafreien Hb-Lösungen (SFH-Lösungen) handelt es sich um Ersatzstoffe, die weder Membranstrukturen noch irgendwelche Antigendeterminanten enthalten. Es entfallen damit sowohl die Probleme der Typisierung als auch der Sensibilisierung eines Vollblutes. Die Präparation von SFH kann hepatitissicher erfolgen. Durch Lyophilisation wird eine langfristige Konservierung möglich.

Physiologisch liegt das Sauerstoff übertragende Hämoglobin-Molekül als Tetramer im Erythrozyten vor, dessen Lebenszeit ungefähr 120 Tage beträgt. Im Vergleich dazu haben SFH-Lösungen eine intravasale Haltbarkeit von maximal zwei Stunden (MESSMER 1978). Sie sind auch aufgrund ihrer hohen O_2-Affinität (starke Linksverschiebung der Sauerstoff-Dissoziationskurve) lediglich zum O_2-Transport im Kreislauf, nicht jedoch zur O_2-Abgabe an das Gewebe befähigt. Im Gegenteil, der Peripherie kann durch die Ersatzlösung sogar noch Sauerstoff entzogen werden. Ursache der Erhöhung der O_2-Affinität ist in erster Linie das Fehlen der Erythrozytenmembran und der damit verbundene Verlust an 2,3-DPG. Außerdem ist eine starke Beeinträchtigung der kooperativen Effekte zu beobachten. Die kurze intravasale Halbwertszeit von SFH ist u.a. eine Folge der Dissoziation des tetrameren Moleküls in Dimere (PRISTOUPIL 1981), die transkapillär filtriert werden (Nachweis im Urin und Ductus Thoracicus Lymphe).

Mit besserem Verständnis des Hb-Moleküls (PERUTZ 1979) erkannte man auch die Grenzen der Möglichkeiten : ein Ersatzstoff auf der Basis von Hämoglobin kann nicht durch triviale wässrige Lösungen von gereinigtem Hämoglobin gewonnen werden.

Die seit Jahren laufenden Bestrebungen, nicht nur die hohe

O_2-Affinität der SFH-Lösungen zu senken, sondern auch die Dissoziation des Hb-Moleküls durch entsprechende Modifikationen zu verhindern und damit die intravasale Halbwertszeit zu erhöhen (BENESCH 1973, SCHMIDT 1979, DAVIS 1982, SEHGAL 1984), haben bisher zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt.

Studien zur Herstellung mikroverkapselter Hb-Lösungen wurden ebenfalls vorgenommen. Unter anderem sind synthetische Polymere wie Polystyrene, Nylon, Zellulose-Acetat, Collodion (CHANG 1980) oder Alginat (PILLWAT 1980) zum Einsatz gekommen. Eines der Hauptprobleme für eine erfolgversprechende Weiterentwicklung liegt in der rapiden Aufnahme dieser Mikropartikel in das RES.

1.4. SYNTHETISCHE CHELATE

Imitationen des Hb-Moleküls durch verschiedene Eisenporphyrine bzw. die Immobilisierung der Hämgruppe an unterschiedliche Polymere sind als Vertreter einer dritten Gruppe aus dem Bereich der Komplexchemie zu erwähnen (BAYER 1977, TSUCHIDA 1983, BALDWIN 1983). Sie haben allerdings für den physiologischen O_2-Transport bislang nur theoretische Bedeutung. Sie spielen bei der Entwicklung eines Sauerstoff übertragenden Blutersatzstoffes keine Rolle.

1.5. LIPOSOMEN

Bei der Suspendierung von gereinigten, aus Zellmembranen isolierten Phospholipiden in wässrigem Medium bilden sich spontan wieder geschlossene Membransysteme zurück. Diese Systeme reagieren auf

Konzentrationsänderungen im Außenmedium wie Osmometer, es entstehen in sich geschlossene Vesikel (BANGHAM 1965).

Die Vesikel bauen sich aus einer oder mehreren Lamellen auf. Jede Lamelle besteht aus einem Lipidbilayer und ist von der nächsten durch einen wässrigen Zwischenraum getrennt (s.Abb. 1). Die Bilayer-Strukturen bilden sich nur dann aus, wenn die Lipide oberhalb ihrer Übergangstemperatur (im flüssigkristallinen Zustand) eingesetzt werden. Unterhalb der Übergangstemperatur sind Lipidvesikel instabil. SESSA und WEISSMANN (1970) faßten die bis dahin gesammelten Daten über Eigenschaften und Verhalten von Lipidvesikeln zusammen und verwendeten zum erstenmal den Ausdruck Liposomen.

Liposomen werden seitdem in der Biochemie, der Pharmakologie und der Molekularbiologie als Membranmodelle eingesetzt, da durch den Einbau von Ladungsträgern, Steroiden und Proteinen der Phospholipid-Bilayer einer natürlichen Membran angenähert werden kann (GREGORIADIS 1976a,b).

Der Einschluß von biologisch aktiven Substanzen, speziell von Enzymen, in künstlich hergestellte Vesikel aus Phospholipiden, sogenannten Liposomen, bilden seit Jahren interessante Projekte vieler Forschungsgruppen (EYTAN 1975, TURNER 1978, PHILIPPOT 1983).

Liposomen als Carrier machen das Verteilungsverhalten im Organismus von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanz unabhängig. Zudem bleibt die Substanz solange dem Metabolismus entzogen, wie sie im Träger eingeschlossen ist. Die Eigenschaften des Trägers können durch geeignete Wahl der Lipide und anderer möglicher Membrankomponenten in viel größerem Umfange variiert werden, als das mit dem zu applizierenden Wirkstoff möglich ist. Das Verhalten von

Liposomen in vivo kann leichter als der eigentliche Wirkstoff manipuliert werden.

Bedingt durch die zahlreichen Herstellungsmethoden und -bedingungen, bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel, Lipide und Lipid-Emulgator-Verhältnisse, entstehen Liposomen unterschiedlichster Art (HUANG 1969, JOHNSON 1971, TRÄUBLE 1971, BATZRI 1973, SLACK 1973, PAPAHADJOPOULOS 1975, DEAMER 1976, BRUNNER 1976, KREMER 1977, SZOKA 1978, MILSMANN 1978, BARENHOLTZ 1979, OLSON 1979, RHODEN 1979, ENOCH 1979, KIM 1981, CUPPOLETTI 1981, OKU 1982). Die in den letzten Jahren veröffentlichten Untersuchungsergebnisse über Experimente mit Liposomen zeigen deshalb mehr oder weniger deutlich, daß kaum allgemein gültige Aussagen über das Verhalten von Liposomen sowohl in vivo als auch in vitro getroffen werden können. Der Grund dafür liegt in der Verwendung von sehr heterogenen Liposomen-Präparaten, die sich in ihren Größen (200Å-100µm), in den Oberflächenladungen der Membranen (neutral, negativ, positiv) und in ihren Bilayerstrukturen (multilamellar, oligolamellar, unilamellar, cholesterinhaltig, proteinhaltig) stark unterscheiden.

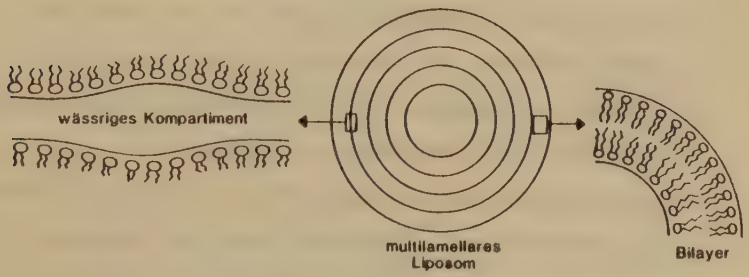


Abb.1 Modell eines Phospholipid-Vesikels

2. PROBLEMSTELLUNG

Meine eigenen Arbeiten auf dem Gebiet eines Sauerstoff übertragenden Blutersatzstoffes hatten zum Ziel, Hämoglobin-Moleküle in Liposomen einzuschließen.

Da Hämoglobin onkoosmotisch aktiv ist, wird seine freie Lösung physiologisch auf 7 g% limitiert, im Gegensatz zu 30 g% im Erythrocyten (SEHGAL 1981). Eine ausreichende O_2-Transportkapazität wäre damit ausgeschlossen.

Es mußte eine geeignete Herstellungsmethode gefunden werden, die in schonender Weise Hämoglobin in Liposomen einbaut, ohne das Molekül funktionsunfähig zu machen.

Durch die Verwendung von Hämoglobin sollte gewährleistet sein, daß

1.) der Sauerstoff als Ligand chemisch gebunden wird, um eine gute Anpassung an physiologische O_2-Partialdrücke zu erreichen

2.) die physiologisch wichtige Kooperativität der Untereinheiten (Sigmoidität der O_2-Dissoziationskurve) durch die tetramere Struktur liposomal verpackter Hämoglobin-Moleküle erhalten bleibt und

3.) eine Verschiebung der O_2-Dissoziationskurve und damit der O_2-Affinität des Hämoglobin-Moleküls durch intravesikuläre Zugabe von organischen Phosphaten manipuliert werden kann.

Aufgrund der biochemischen Beschaffenheit der Hb-Liposomen sind keine toxischen Nebenwirkungen zu erwarten - sowohl das verwendete Phospholipid als auch Hämoglobin kann physiologisch metabolisiert werden. Blutgruppenspezifische Immunreaktionen sind ebenfalls ausgeschlossen, da die künstlichen Membranoberflächen keine

entsprechenden Antigenstrukturen aufweisen.

Das Hb-Liposom sollte in seiner Größe und in seinem Aufbau charakterisiert werden. Die Herstellungsmethode sollte hinsichtlich der Größe und Struktur einheitliche, homogene Hb-Liposomen liefern. Sowohl das in vitro Verhalten von Hb-Liposomen als auch ihr Schicksal in vivo sollte untersucht werden.

3. MATERIAL

3.1. VERSUCHSTIERE

Zur Verwendung kommen ausschließlich ausgewachsene, männliche Sprague Dawley Ratten (Exbreeder).

3.2. LÖSUNGEN, MEDIEN

Phosphatpuffer I (isotonisch)	:	10 mM $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$ (1.78 g) 150 mM NaCl (8.77 g) pH = 7.35 (mit 1 M HCl einstellen)
Phosphatpuffer II (hypertonisch)	:	20 mM $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$ 300 mM NaCl pH = 7.35
Phosphatpuffer III (hypotonisch)	:	5 mM $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$ (0.9 g) 5 mM NaCl (0.3 g) pH = 7.35

Die Puffer werden vor Gebrauch an der Wasserstrahlpumpe entgast.

Szintilator	:	Unisolve I (Zinsser Analytic U.K. Ltd.)
Percoll	:	1.13 g/ml Pharmacia

3.3. CHEMIKALIEN

Inulin, [^{3}H(G) -]	New England Nuclear NET-314L Spez.Akt.: 70 mCi/mMol MG : 5000-5500 Reinheit : 99%
Phosphatidylcholine, L-α-dipalm-[2-palm-9, 10-^{3}H]-	New England Nuclear NET-689 Spez.Akt.: 60 mCi/mMol MG : 734 Reinheit : 98%
Octyl-ß-D-Glucopyranoside, [Glucose-^{14}C(U)] -	New England Nuclear NEC-740 Spez.Akt.: 314 mCi/mMol MG : 292 Reinheit : 98%
Methemoglobin, [Methyl-^{14}C] Methylated-	New England Nuclear NEC-728 Spez.Akt.: 3.51 x 10^{-7} mCi/mMol MG : 64500 Reinheit : 99.8%
L-3-Phosphatidylcholine, ß-[1-^{14}C] Palmitoyl-α'-1-Palmitoyl	Amersham International Ltd. CFA-601 Spez.Akt.: 59 mCi/mMol MG : 734 Reinheit : 98%
[Carboxyl-^{14}C] Cholic Acid Sodium Salt	Amersham International Ltd. CFA-482 Spez.Akt.: 52 mCi/mMol MG : 432 Reinheit : 99%
1-O-n-Octyl-ß-D-glucopyranosid	MG : 292.4 Boehringer
L-α-Phosphatidyl Choline aus frischem Hühnereiweiß	Type XI-E Sigma

Cholsäure-Na-Salz	MG : 430.5 Serva Reinheit : 99%
2,3-Diphospho-D-Glycerinsäure Pentanatrium-Salz	MG : 376 Sigma
MOPS (3-[N-Morpholino] propansulfonsäure) Freie Säure, pH-Bereich 6.5-7.9	MG : 209.3 Sigma
Human-Albumin	Globulin frei Sigma
Human-IgG	salzfrei Sigma
Human-Transferrin (Siderophilin)	eisenfrei Sigma Reinheit : 98%
Human-Globulin	Cohn-Fraktion IV-4 Sigma
Human-Globulin	Cohn-Fraktion IV-1 Sigma
Human-Globulin	Cohn-Fraktion II Sigma
Human-Globulin	Cohn-Fraktion III Sigma
Human-Albumin	Cohn-Fraktion V Sigma
Human-Fibronektin	Sigma
Ratten-Albumin	Cohn-Fraktion V Sigma
Ratten-IgG	Calbiochem Reinheit : 98%
Ratten-γ-Globulin	aus Cohn-Fraktion II,III Sigma Reinheit : 99% 2-4% NaCl
Albumin aus Rinderserum	Cohn-Fraktion V Serva Reinheit : 92%

Myoglobin vom Wal	Skelettmuskel Typ II Sigma
D-α-Tocopherol	MG : 430.7 Serva reinst
Heparin-Na 25000 IE/5ml	Medac GmbH, Hamburg
Phenobarbital-Na 60 mg/ml (Nembutal)	CEVA GmbH, Bad Segeberg

Wenn nicht anders im Text vermerkt, wurden alle anderen Chemikalien p.a. von der Fa.Merck, Darmstadt bezogen.

3.4. GERÄTE

Biolumat LB 9505	Fa.Berthold
Cellcounter 134	Analys Instrument
Computer-Zubehör :	
Apple II europlus	Apple
Drucker MX-82 F/T	Epson
ß-Counter	Packard
Durchflußdialyse-Gerät (Lipoprep)	Dianorm, Diachema A.G.Zürich
Druckdialysezelle Modell 12	Amicon
Elektrophorese-Apparatur :	
Multiphor 2117	LKB
Power Supply 2103	LKB
Multitemp-Kühler 2209	LKB
Diffusions-Entfärber	Desaga
Säulenchromatographie-Zubehör :	
Fraktionssammler Frac-100	Pharmacia
Monitor Uvicord S 2138	LKB
2-Kanal-Schreiber 2210	LKB
Mikroperpex-Pumpe 2132	LKB

Gas-Chromatograph 5710 A mit Integrator 3390 A	Hewlett-Packard
Halbmikro-Osmometer	Dr.H.Knauer K.G.
Lyophilisator Beta I	Christ
Nano-Sizer	Coulter-Electronics Ltd.
Rechner 97 I/O-Calculator	Hewlett-Packard
ODC-Meßgerät Erythrox mit Myrenne-Computer	M.B.V. Aachen
Spektralphotometer DMR 10	Zeiss
Ultraschall-Gerät Sonifier B-12	Branson Sonic Power Comp.

Zentrifugen :

Cryofuge 6-6	Heraeus
J-6 Centifuge	Beckman
L5-75	Beckman
Prep.U.V.Scanner	Beckman
Zentrifuge 5412	Eppendorf

4. METHODEN

4.1. Photometrische Messungen

4.1.1. Lowry-Proteinbestimmung

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in wässrigen Lösungen wird eine modifizierte Methode von Lowry angewendet (RICHTERICH 1968).

Lösungen :

I) Phenol-Reagenz nach Folin-Ciolcateu
von Merck
Das Reagenz wird mit Aqua dest. 1:2 (v/v)
verdünnt und in brauner Flasche bei 4° C
aufbewahrt

II) Natrium-Carbonat-Lösung (2%, 0,04 M)
2g Na_2CO_3 werden mit Aqua dest.
auf 100 ml aufgefüllt
bei RT unbeschränkt haltbar

III) Kupfersulfat-Lösung (1%, 0,04 M)
1g $Cu_2SO_4 x\ 5\ H_2O$ werden mit Aqua dest.
auf 100ml aufgefüllt
bei RT unbeschränkt haltbar

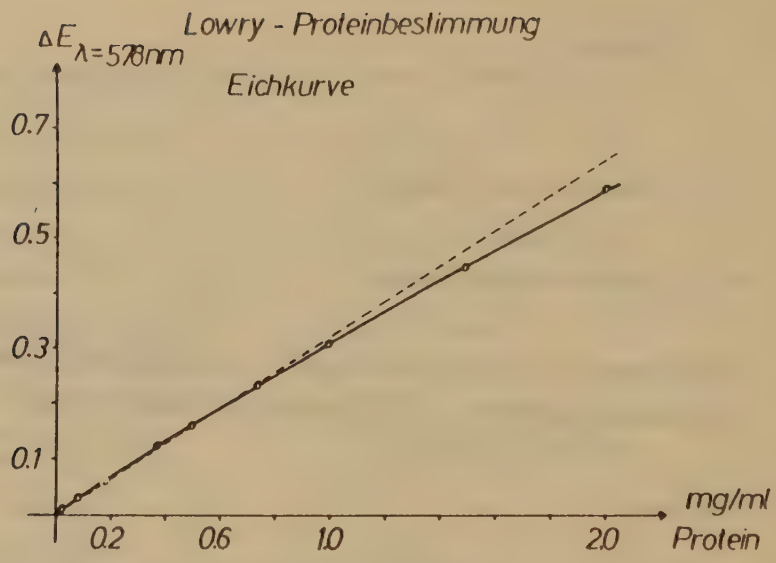


Abb.2 Eichkurve mit BSA erstellt, Reinheitsgrad von 92% wurde berücksichtigt

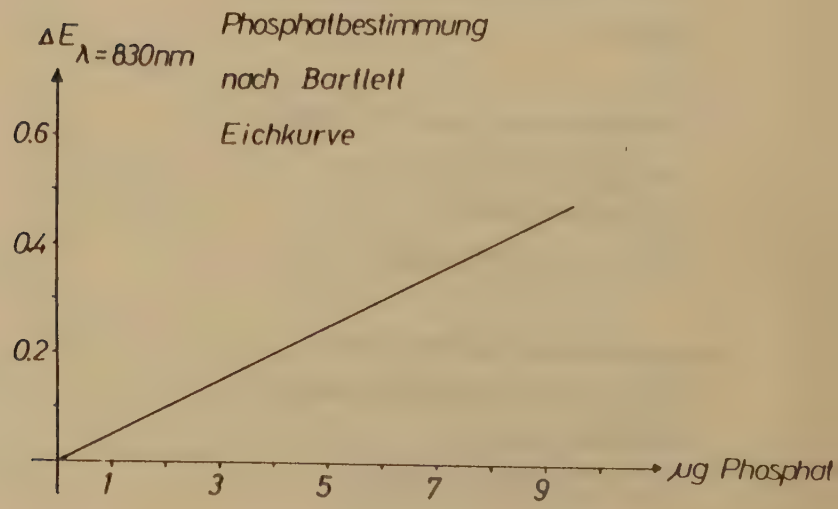


Abb.3 Eichkurve mit KH_2PO_4 in Aqua bidest.

IV) Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung (2%, 0,071 M)

2g K-Na-Tartrat x 4 H_2O werden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt

bei RT unbeschränkt haltbar

V) Folin-Gebrauchslösung

0.5 ml Lösung III + 0.5 ml Lösung IV gut mischen, mit Lösung II auf 50 ml auffüllen

Vor jedem Gebrauch frisch ansetzen !

Zu 2 ml der Gebrauchslösung werden 0.1 ml der Probe pipettiert (beim Leerwert 0.1 ml Aqua dest.), gut durchgemischt und nach 10 Minuten 0.2 ml des Phenol-Reagenz hinzugefügt. Nach 30 Minuten wird bei einer Wellenlänge von 578nm die Extinktion gegen Aqua dest. gemessen.

Da das Lambert-Beersche Gesetz nur in einem linearen Meßbereich seine Gültigkeit besitzt (s.Abb. 2), werden zu hohe Proteinkonzentrationen vor einer genauen Bestimmung entsprechend runterverdünnt.

4.1.2. Phosphatbestimmung nach Bartlett

Die für die Phosphatbestimmung nach BARTLETT (1959) benutzten Reagenzgläser sind fett- und phosphatfrei. Die Schwefelsäurekonzentration wird im Ansatz auf ca. 1 N eingestellt, da bei Konzentrationen unter 0.6 N eine unspezifische Färbung, bzw. über

1.8 N keine Färbung eintritt.

Die Eichkurve bleibt bis ca. 10 µg Phosphor linear (s.Abb. 3).

Lösungen :

I)	10 N H_2SO_4	0.5 ml je Probe
II)	30 %ige H_2O_2	2 Tropfen " "
III)	0.22 %ige Ammonium-Molybdat-Lsg.	4.6 ml " "
IV)	Fiske-Subbarow-Reducer (1480 mg/10ml H_2O), Sigma	0.2 ml " "

Die zu messende Probe (Volumen bis zu 2 ml) wird mit 0.5 ml Lösung I bei 160° C 3 Stunden verascht. Nach Zugabe von Lösung II wird weitere 1.5 Stunden bei 160° C verascht. Die Probe wird dann in 4.6 ml Lösung III aufgenommen, mit 0.2 ml Lösung IV versetzt und 10 Minuten bei 100°C gehalten (Gläschen verschließen).

Die Auswertung erfolgt photometrisch bei 830 nm.

Der Phosphatgehalt von Hb-Lösungen während der Liposomen-Präparation (Dialyse-Methode) wird untersucht.

Dazu werden die Hb-Lösungen mit Hilfe der Druckdialyse auf einen 10 mM MOPS-Puffer (150 mM NaCl, pH = 7.35) umgepuffert und eine Sepharose 4B-Cl Säule (K 26/60) mit diesem Puffer äquilibriert.

4.1.3. Hämoglobin-Cyan-Methode

Nach dieser Methode werden Hämoglobin-Konzentrationen bestimmt. Es wird eine Testkombination der Fa.Boehringer Mannheim verwendet.

Die Hb-Konzentration berechnet sich nach

$$C = \frac{MG}{\varepsilon \cdot d \cdot 10^4} \cdot \frac{V}{v} \cdot F \cdot E \quad \left[g/dl \right]$$

wobei MG von Hb : 64500 Daltons
ε von Hämiglobin-
cyanid bei 546nm : 44 cm / µMol
d : Schichtdicke der Küvette in cm
v : Volumen der eingesetzten Probe in ml
V : Volumen des Gesamtansatzes in ml
F : Vorverdünnung der Probe
E : gemessene Extinktion bei 546 nm
C : Konzentration von Hb in g/dl

4.2. Isoelektrische Fokussierung

Für die analytische Elektrofokussierung von Proteinen auf 5%igen Polyacrylamid-Gelen werden LKB-Ampholine-PAGplates im pH-Bereich von 3.5 - 9.5 benutzt (Vernetzungsgrad 3%, Ampholine-Konzentration 2,4% w/v, Geldicke 1mm).

Lösungen :

I)	Fixier-Lösung	58 g Trichloressigsäure 17 g Sulfosalicylsäure mit H_2O auf 500 ml auffüllen
II)	Entfärbe-Lösung	250 ml Äthanol 80 ml Eisessig mit H_2O auf 1 l auffüllen
III)	Färbe-Lösung	0.5 g Coomassie Blue R-250 in 500 ml Entfärbelösung

IV) Konservierungs-Lösung 40 ml Glycerin
zu 400 ml Entfärbelösung

Als Anoden-Lösung dient 1 M H_3PO_4, als Kathoden-Lösung 1 M NaOH. Das Gel wird nach Kühlung auf 0° C bei 2000 V, 50 mA und 25 Watt eine halbe Stunde lang vorfokussiert (RIGHETTI 1981).
Die Konzentration der Protein-Stammlösung wird auf 2 mg/ml eingestellt. 10 µl werden mittels Auftragsplättchen auf das Gel gegeben. Für jede Probe werden drei verschiedene Auftragspositionen gewählt (nahe Anode, Mitte, nahe Kathode). Nach 30 Minuten werden die Auftragsplättchen entfernt, nach insgesamt 1,5 Stunden ist die Fokussierung beendet (Stromfluß nahezu Null).
Zur späteren Bestimmung der isoelektrischen Punkte wird mit Hilfe eines Kontakt-pH-Meters der pH-Gradient zwischen den Elektroden gemessen.
Das Gel wird unverzüglich in die Fixierlösung gelegt und 30 Minuten leicht geschüttelt. Danach wird das Gel 5 Minuten lang in der Entfärbelösung gewaschen und dann 30 Minuten bei 60° C in der Färbelösung gehalten. Nach mehrmaligem Wechsel des Entfärbebades ist der Gelhintergrund klar. Das Gel wird zur Konservierung 1 Stunde in die Konservierungslösung IV getaucht, über Nacht bei RT getrocknet und zur Dokumentation auf einer Folie ausgerollt.

4.3. Gaschromatographische Untersuchungen

Die Lipide werden mit Chloroform/Methanol aus der wässrigen Phase extrahiert, verseift und für die Messung in einen Methylester überführt.

Lipidextraktion : 20 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v)
1 ml wässrige Probe

Die Mischung wird 10-15 Minuten geschüttelt und dann 15 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert (Haereus-Zentrifuge). Von der organischen Phase werden je 0.8 ml in Reactivals (1 ml) gefüllt und mit N_2 überschichtet. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Proben tiefgefroren.

Methylester-Synthese :

Das organische Lösungsmittel wird mit Stickstoffgas abgeblasen.

A) Verseifung : 50 µl methanolische 0.5 N NaOH werden ins Reactival eingespritzt und 5 Minuten bei 100° C inkubiert. Danach wird das Methanol mit Stickstoff abgeblasen.

B) Veresterung : 50 µl 20 %ige methanolische Bortrifluorid-Lösung werden ins Reactival eingespritzt und 5 Minuten bei 100° C inkubiert. Nach Abblasen des Methanols mit Stickstoff werden 300 µl gesättigte NaCl-Lösung und 200 µl Pentan eingespritzt. Es wird mindestens 2 Minuten geschüttelt, um die

Fettsäuremethylester in die organische Phase zu überführen.
Die Pentanphase wird unter Stickstoff-Atmoshäre in ein neues Reactival gefüllt. 1 µl dieser Probe werden in den Gaschromatographen eingespritzt (FFAP-Säule, Nachweisgrenze 10 ng/µl).
Der Grad der Autoxidation von Fettsäuren während der Liposomen-Präparation wird mit dieser Methode bestimmt.

4.4. S-Wert-Bestimmungen mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge

Der Sedimentationskoeffizient ist gleich der Sedimentationsgeschwindigkeit pro Radialbeschleunigung. Er wird in Svedbergeinheiten angegeben (1 S = 10^{-13}sec) und hat die Dimension 1/sec.
Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten wird die Sedimentation in einer Doppelsektor-Meßzelle mittels eines Monitor-Systems während der Ultrazentrifugation verfolgt (Beckman AN-A Prep UV-Scanner).
Die ermittelten S-Werte werden nicht auf Wasser als Lösungsmittel und 20° C normiert. Da immer gleiche Versuchsbedingungen eingehalten werden (OD = 0.9 bei 280 nm, 10 mM Phosphatpuffer I, 150 mM NaCl, pH = 7.35), können die unkorrigierten Werte als "relative S-Werte" untereinander verglichen und bewertet werden.
Aus der Sedimentationsgeschwindigkeit wird die Zentrifugendauer zur Liposomen-Pelletierung errechnet :

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} \qquad v = \frac{\Delta x}{\Delta t}$$

x = zurückgelegte Strecke des Teilchens in der Meßzelle
t = Sedimentationszeit des Teilchens

Da die Sedimentationskonstante umgekehrt proportional der Viskosität des verwendeten Mediums ist, werden die S-Werte von Hb-Liposomen für die UZ-Methode (siehe dort) sowohl im Puffer als auch im Serum als Medium bestimmt und die Zentrifugenzeit entsprechend eingestellt.

4.5. Säulenchromatographische Untersuchungen

Zur Molekulargewichts-Bestimmung der Hb-Präparate werden Ausschlußvolumen und Trennvermögen einer Sephacryl S-300 Säule (K12/150) bestimmt.
Zur Abtrennung der Liposomen von nicht eingeschlossenem Material (Inulin, Hämoglobin, Emulgatoren) wird eine Sepharose 4B-Cl Säule (K24/60) mit isotonischem Phosphatpuffer I als Elutionsmittel verwendet.

4.6. Berechnungen zur Radioaktivität doppelt markierter Proben mit Quenchkorrektur

Da sich die Energiespektren der verwendeten Isotope ^{3}H (Strahlungsenergie 0.0186 Mev) und ^{14}C (Strahlungsenergie 0.155 Mev) genügend stark unterscheiden, lassen sich diese Isotope in einer Probe

parallel bestimmen (WORK 1976).

Durch den Einfluß von Serum und Hämoglobin (Farbquench, chemischer Quench) sowie Wasser (chemischer Quench) und anderen Bestandteilen können Proben nicht immer mit gleicher Effektivität gemessen werden. Um Proben mit unterschiedlicher Quench-Charakteristik vergleichen zu können, werden Eichkurven erstellt.

Dazu werden eine Reihe von Proben mit der gleichen, bekannten Aktivität, aber mit verschiedenen Quencherkonzentrationen (Quencher : wässrige Hb-Lösung) gemessen und mit Hilfe eines externen Standards die Zählausbeute (ZA) einer jeden Probe bestimmt (s.Abb. 4). Bei 14C-markierten Proben wird zusätzlich noch die Einstreuung (EF) in den 3H-Kanal ermittelt (s.Abb. 5).

Zur Berechnung der absoluten Zerfälle pro Minute (dpm) wird der Wirkungsgrad des verwendeten Counters über einen geeigneten Standard bestimmt und die absolute Zählrate errechnet :

$$dpm(^3H) = \frac{cpm(^3H) - BG(^3H) - \left[cpm(^{14}C) - BG(^{14}C)\right] \cdot EF}{ZA(^3H)}$$

$$dpm(^{14}C) = \frac{cpm(^{14}C) - BG(^{14}C)}{ZA(^{14}C)}$$

(BG = Background)

Die Proben (0.5 ml wässrige Lösung + 9.5 ml Szintilator) werden bis 10000 counts ausgezählt, so daß eine relative Standardabweichung von 1 % vorliegt. Die Einzelmessung liegt dann mit einer Wahrscheinlichkeit von 68.3 % in diesem Fehlerbereich (Poissonsche Verteilungskurve).

Beträgt das externe Standardverhältnis einer Probe weniger als 0.3, so

wird die Probe so weit es geht verdünnt, um den Farbquench zu unterdrücken. Proben mit einem externen Standardverhältnis unter 0.3 werden nicht ausgewertet.

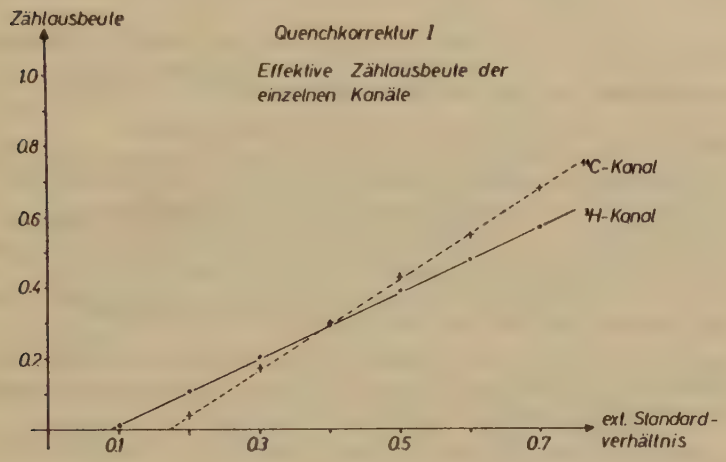


Abb.4

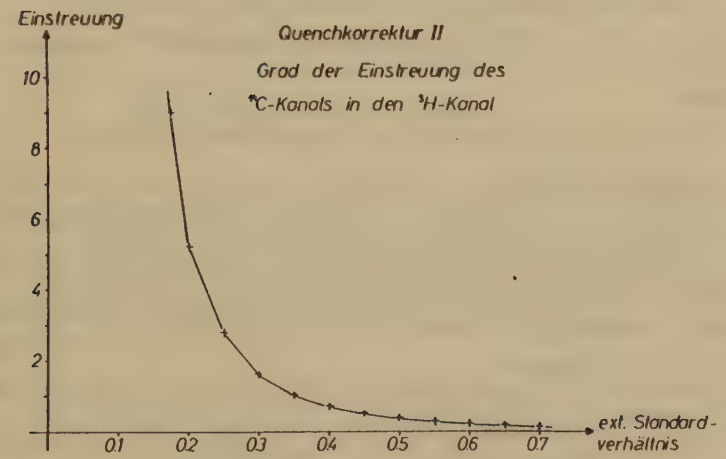


Abb.5

4.7. Hämoglobin, Isolierung und Charakterisierung

4.7.1. Hämoglobin-Lösung

Hb-Lysat wird aus abgelaufenen Blutkonserven bzw. frisch entnommenem Blut gewonnen. Das Blut wird 5 Minuten bei 2000 g (= 3000 rpm Haereus-Zentrifuge) zentrifugiert. Das Plasma und die Leukocytenschicht werden abgesaugt, die roten Zellen in isotonischem Phosphatpuffer I im Verhältnis 1:3 (v/v) aufgenommen und zweimal gewaschen. Ein dritter Waschgang erfolgt mit einer 1.6%igen hypertonischen NaCl-Lösung, um eine Ablösung noch haftender Immunglobuline zu bewirken (DOCZI 1976). Nach einer variierten Methode von DODGE (1963) werden die Zellen im Verhältnis 1:3 (v/v) in hypotonischem Phosphatpuffer III eine Stunde bei 4° C suspendiert und lysiert.

Die Erythrocyten-Ghosts werden 30 Minuten bei 140000g (Beckman Ultrazentrifuge) abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Hb-Überstand wird mit hypertonischem Phosphatpuffer II isotonisch gemacht.

Es folgt eine Filtrierung durch 0.2 µm-Membranen, um eventuell vorhandene Mikroaggregate zu entfernen. Dann wird das Hb-Lysat auf einer Sephacryl S-300 Säule (K 26/150) aufgetrennt, die Hb-Fraktionen gepoolt und mittels Ultrafiltration auf das Auftragsvolumen eingeengt. Die so gewonnene Hb-Lösung wird in 8 ml Portionen bis zur Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

Der oxigenierte, deoxigenierte bzw. MetHb-Gehalt wird nach einer Methode von BENESCH (1973) (s.4.7.2.) bestimmt.

Membranlipide im Lysat werden durch gaschromatographische Untersuchungen ausgeschlossen (s.4.3.).

Die Sauerstoff-Freisetzungskapazität wird aus gemessenen Sauerstoff-Dissoziationskurven ermittelt (s.4.8.2.5.).

4.7.2. Spektrophotometrie

Die Spektren von Hb-Lösungen werden mit einem Spektralphotometer (DMR 10, Zeiss) aufgenommen (s.Abb. 6). Zur Bestimmung der Hb-Konzentration und den Anteilen an HbO_2 (Oxyhämoglobin), Hb (Deoxyhämoglobin) und MetHb (Methämoglobin) werden Gleichungen von BENESCH (1973) herangezogen.

Danach lassen sich die molaren Konzentrationen der drei Komponenten als Funktion ihrer Absorbtionen bei verschiedenen Wellenlängen berechnen :

$$A(\lambda_1) = \varepsilon_D(\lambda_1)\cdot C_D + \varepsilon_O(\lambda_1)\cdot C_O + \varepsilon_M(\lambda_1)\cdot C_M$$

$$A(\lambda_2) = \varepsilon_D(\lambda_2)\cdot C_D + \varepsilon_O(\lambda_2)\cdot C_O + \varepsilon_M(\lambda_2)\cdot C_M$$

$$A(\lambda_3) = \varepsilon_D(\lambda_3)\cdot C_D + \varepsilon_O(\lambda_3)\cdot C_O + \varepsilon_M(\lambda_3)\cdot C_M$$

wobei A_λ die gemessene Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge ist. C_D, C_O und C_M bedeuten die molaren Konzentrationen von Deoxy-, Oxy- und MetHb. ε sind die zugehörigen Extinktionskoeffizienten bei einer bestimmten Wellenlänge .

Bei bekannten Extinktionskoeffizienten und den gemessenen Absorptionen bei gegebener Wellenlänge können die drei Gleichungen nach C_O, C_D und

C_M aufgelöst werden :

$$[HbO_2] = (1.4747 \cdot A_{576} - 0.6820 \cdot A_{560} - 0.5329 \cdot A_{540}) \cdot 10^{-4}$$

$$[Hb] = (1.4749 \cdot A_{560} + 0.2141 \cdot A_{576} - 1.1042 \cdot A_{540}) \cdot 10^{-4}$$

$$[MetHb] = (4.5852 \cdot A_{540} - 0.8375 \cdot A_{560} - 3.7919 \cdot A_{576}) \cdot 10^{-4}$$

Da für MetHb das Absorptionsmaximum bei 630 nm liegt, werden zur genaueren Bestimmung kleiner MetHb-Anteile in den Hb-Lösungen folgende Gleichungen verwendet :

$$[HbO_2] = (1.0130 \cdot A_{576} - 0.3269 \cdot A_{630} - 0.7357 \cdot A_{560}) \cdot 10^{-4}$$

$$[Hb] = (1.3730 \cdot A_{560} - 0.7470 \cdot A_{576} - 0.7370 \cdot A_{630}) \cdot 10^{-4}$$

$$[MetHb] = (2.9850 \cdot A_{630} - 0.1940 \cdot A_{576} - 0.4023 \cdot A_{560}) \cdot 10^{-4}$$

Alle Messungen werden in isotonischem Phosphatpuffer I vorgenommen. Die Berechnungen werden mit Hilfe eines Computer-Programms an einem HP-Rechner durchgeführt.

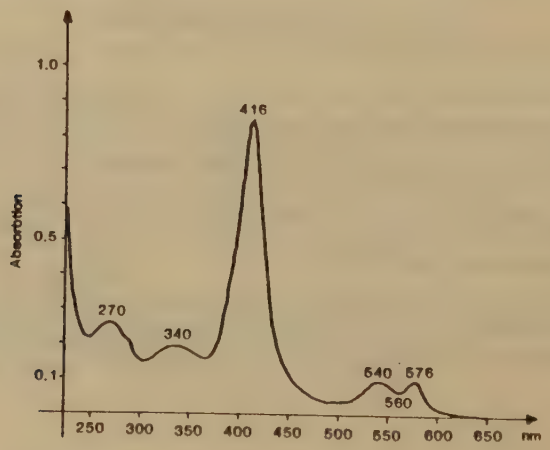


Abb.6 Hämoglobin-Spektrum

4.7.3. Emulgator-Inkubationen

Sowohl Cholat als auch n-Octyl-GP werden bei der Liposomenherstellung als Emulgatoren für die Lipide verwendet. Ihre mögliche Wechselwirkungen mit Hämoglobin werden geprüft.
Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden werden die Hb-Lösungen spektrophotometrisch untersucht (s.4.7.2.). Es wird eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt (s.4.2.), der S-Wert bestimmt (s.4.4.) und Sauerstoff-Dissoziationskurven (ODC) erstellt (s.4.8.2.5.).

4.7.4. Lagerstabilität

Hb-Lösungen werden fünf Wochen lang bei RT, 4° C und -20° C aufbewahrt. Am 1., 2., 11., 20. und 35. Tag wird die Zunahme von Oxy-, Deoxy- und MetHb spektrophotometrisch bestimmt. Außerdem werden ODC erstellt und daraus p(50)-Werte, Hill-Koeffizienten und O_2-Freisetzungskapazitäten ermittelt.

4.8. Liposomen, Präparation und Charakterisierung

4.8.1. Präparationsmethoden

Für alle Präparationen werden die verwendeten Phospholipide, Tocopherol, Cholesterol sowie Emulgatoren in Chloroform/Methanol (1:3 v/v) aufgenommen. Die klare Lösung wird in einem Rundkolben am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Letzte Lösungsmittelreste (schon Spuren von Chloroform stören die Vesikelbildung) werden 3 Stunden unter Hochvakuum (Lyophilisator) abgezogen.

Der so entstandene Lipidfilm (Lipideinwaage:100mg) wird je nach Herstellungsmethode mit Phosphatpuffer oder Äther wieder aufgenommen und zur Liposomenherstellung verwendet.

Um Autoxidationen der Fettsäuren zu vermeiden, wird unter Stickstoff gearbeitet (KLEIN 1970).Die Arbeitstemperatur liegt immer mindestens 10° C oberhalb der Übergangstemperatur der Lipide (Überg.Temp. von L-α -Phosphatidyl Choline : -4° C - +5° C je nach Fettsäure-Anteilen). Um reine Emulgator-Micellen zu vermeiden, wird das Lipid/Emulgator Verhältnis so gewählt, daß immer gemischte Micellen (Phospholipid mit Emulgator) vorliegen, d.h., daß oberhalb der Phasengrenze gearbeitet wird. Für Cholat beträgt das Verhältnis 0.625 und für n-Octyl-GP 0.2.

4.8.1.1. Handshaken/Ultraschall

Als Phospholipid wird Egg Yolk Lecithin verwendet, das mit 1µCi ^{3}H-markiertem Lecithin versetzt wird. Der Lipidfilm wird mit 8 ml ^{14}C-markierter Hb-Lösung solange aufgeschüttelt, bis eine trübe Suspension entstanden ist (handshaken). Die Lösung wird mit einem Branson Sonifier bei 60 Watt ultrabeschallt. Die Beschallungsdauer beträgt eine Stunde (HUANG 1979).
Um die Proben nicht zu stark zu erwärmen, wird das Beschallungsgefäß wassergekühlt und die Beschallung gepulst.
Bei Präparation A erfolgt die Beschallung 15 Sek. im Abstand von 3 Minuten, bei Präparation B 30 Sek. im Abstand von 3 Minuten, bei Präparation C 1 Minute im Abstand von 3 Minuten.
Nach der Beschallung wird nicht eingeschlossenes Hb über eine Sepharose 4B-Cl Säule (K 26/60) von den Liposomen abgetrennt. Die einzelnen Fraktionen werden mit dem Quenchprogramm (s.4.6.) ausgewertet.

4.8.1.2. Gelfiltration

In Anlehnung an eine Methode von BRUNNER (1976) werden Liposomen in der Weise hergestellt, daß das verwendete Detergenz über eine Sepharose 4B-Cl Säule (K 26/90) entfernt wird. Die Liposomen entstehen dann während des Säulenlaufes. Verwendet werden ^{3}H-markiertes Egg Yolk Lecithin (1 µCi), n-Octyl-GP als Detergenz (Lipid/Emulgator = 0.2) und ^{14}C-markierte Hb-Lösung (8 ml, 5 µCi). 3 ml der Mischung werden auf

die Säule aufgetragen und in 1 ml Fraktionen eluiert. Aus dem Elutionsdiagramm (Aktivität in dpm gegen Fraktionsvolumen) wird der Einbau von Hb in die Liposomen berechnet.

4.8.1.3. Ätherinjektion

Nach Vorschlägen mehrerer Autoren (BATZRI 1973, DEAMER 1976, KREMER 1977) können Liposomen durch eine sogenannte Injektionsmethode hergestellt werden.
Dabei wird das verwendete Lipid (^{3}H-markiertes Egg Yolk Lecithin) in Äther (1 ml) gelöst und ohne Detergenz mit Hilfe einer Hamilton-Spritze (10 µl) in eine erwärmte (37° C) ^{14}C-markierte Hb-Lösung (8 ml) injiziert.
Der verdampfende Äther wird während der Injektion mit Stickstoff abgeblasen (s.Abb. 7). Die Lösung wird noch 3 Stunden gerührt und die entstandenen Liposomen über eine Sepharose 4B-Cl Säule (K 26/60) von nicht eingeschlossenem Hb abgetrennt. Der Einbau von Hb in die Liposomen wird berechnet.

4.8.1.4. Kontrollierte Durchflußdialyse

Liposomen werden hier nach der Dialyse-Methode von MILSMANN (1978) hergestellt (s.Abb. 8).
Als Phospholipid wird Egg Yolk Lecithin verwendet, Cholat und n-Octyl-GP kommen als Emulgatoren zum Einsatz, Cholesterin wird in unterschiedlichen Konzentrationen in die Membran eingebaut.

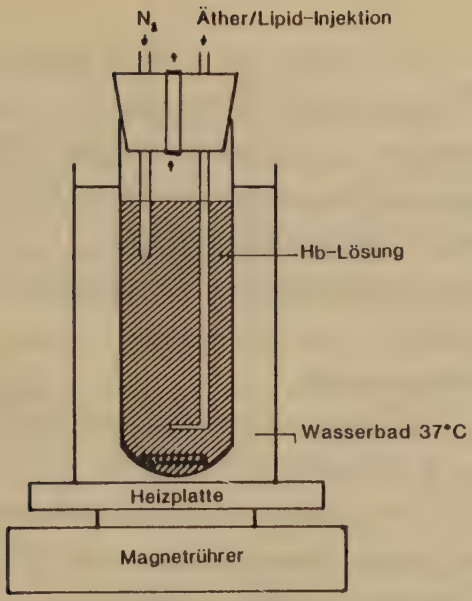


Abb.7 Ätherinjektions-Apparatur

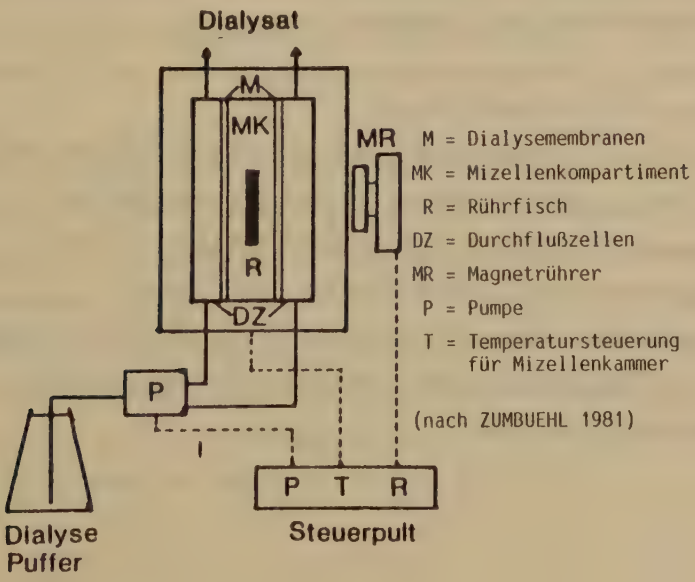


Abb.8 Durchflußdialyse-Apparatur

Die Dialysezeit wird mit Hilfe von radioaktiv markiertem Emulgator ermittelt (^{14}C-n-Octyl-GP bzw. ^{14}C-Cholat).
Die Lipidkonzentration ist in allen Fällen 17 mM (= 100mg/8ml), das molare Verhältnis von Lipid zu Detergenz beträgt 0.625 für Cholat (94mg/8ml) und 0.20 für n-Octyl-GP (200mg/8ml).
Folgende Liposomen werden nach dieser Methode hergestellt :

^{14}C-Hb/ H-Lecithin-Liposomen :
Der mit 1 µCi ^{3}H-Lecithin markierte Lipidfilm wird in 8 ml ^{14}C-markierter Hb-Lösung (2.5 µCi) aufgenommen und die Lösung 3 Stunden bei RT leicht gerührt. 6 ml dieser Lösung werden dann in einer Dialysekammer (Lipoprep, Membranausschluß : 10000 Daltons) gegen 2 Liter isotonischen Phosphatpuffer I dialysiert.
Nicht eingeschlossenes Hb wird über eine Sepharose 4B-Cl Säule (K26/60) von den Hb-Liposomen abgetrennt. Die Liposomen werden bis zur weiteren Verwendung bei RT aufbewahrt.

^{3}H-Inulin/^{14}C-Lecithin-Liposomen :
79 ml isotonischer Phosphatpuffer I werden mit 1 ml ^{3}H-Inulin (200 µCi) versetzt. Davon werden 8 ml für die Liposomenpräparation eingesetzt (Lipidfilm mit 1 µCi ^{14}C-markiertem Lecithin). Die Dialysekammer wird für 3 Stunden mit dem ^{3}H-Inulin-Topf kurzgeschlossen. Danach wird gegen 2 Liter Phosphatpuffer I dialysiert und das nicht eingeschlossene ^{3}H-Inulin über eine Sepharose 4B-Cl Säule (K 26/60) abgetrennt.

^{3}H-Inulin/^{14}C-Liposomen :

39 ml Phosphatpuffer I werden mit 1 ml ^{3}H-Inulin (200 µCi) versetzt. Davon werden 4 ml zu 4 ml einer ^{14}C-markierten (2.5 µCi) Hb-Lösung (doppelte Konzentration durch Einengung mittels Druckdialysekammer) gegeben und für die Liposomenpräparation eingesetzt. Der Rest der 36 ml ^{3}H-Inulin-Lösung wird mit Phosphatpuffer I auf 72 ml aufgefüllt und mit der Dialysekammer 3 Stunden kurzgeschlossen. Danach wird gegen 2 Liter Phosphatpuffer I dialysiert und das nicht eingeschlossene Hb und Inulin über eine Sepharose 4B-Cl Säule (K 26/60) abgetrennt.

Cholesterinhaltige ^{14}C-Hb/^{3}H-Lecithin-Liposomen :

Cholesterin wird im Verhältnis zu Lecithin so eingewogen, daß 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 20 und 30 prozentige Cholesterin-Liposomen resultieren. Cholesterin wird zusammen mit Lecithin und dem Emulgator n-Octyl-GP am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt und wie beschrieben (s. ^{14}C-Hb-^{3}H-Lecithin-Liposomen) zu Liposomen präpariert. Nicht eingeschlossenes Material wird säulenchromatographisch abgetrennt.

^{14}C-Hb/^{3}H-Lec-Liposomen mit Tocopherol und 2,3-DPG :

Der Lipidfilm enthält im Verhältnis zu Lecithin 2,5% Tocopherol. 2,3-DPG wird in äquimolarer Menge zu Hb in 8ml Hb-Lösung eingewogen (1.4mg/8ml). Dieselbe Konzentration an 2,3-DPG enthält ein Vorratstopf (80ml Phosphatpuffer I), der mit der Dialysekammer für 3 Stunden kurzgeschlossen wird. Danach wird gegen 2 Liter Phosphatpuffer I dialysiert und das nicht eingeschlossene Hb über eine Sepharose 4B-Cl Säule (K 26/60) abgetrennt.

4.8.2. Charakterisierung

4.8.2.2. Nanosizer

Der Coulter Nanosizer mißt die durchschnittliche Größe von Teilchen, die sich in Suspension und Emulsion befinden, im Meßbereich zwischen 40 und 3000 nm.

Dem Gerät liegen die Prinzipien der Brownschen Molekularbewegung und der Autokorrelationsspektroskopie von gestreutem Laserlicht zugrunde.

Für die Analyse braucht man weder Formstruktur, Brechungsindex noch Dichte der Materialien zu kennen.

Lediglich Brechungsindex, Viskosität und Temperatur des Suspensionsmediums müssen bekannt sein.

Das Gerät mißt nur periodische Schwankungen der Lichtstreuung, nicht aber Winkel und Intensität der Streuung.

Die Frequenz der Brownschen Bewegung ist umgekehrt proportional der Partikelgröße.

Die periodische Schwankung der Lichtstreuung ist für jede Partikelgröße eine Konstante :

$$T_c = (DK_s^2)^{-1}$$

wobei

$$D = \frac{K_B T}{6\pi \cdot p \cdot R}$$

$$K_s = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\frac{\theta}{2}$$

Dabei ist η= Brechungsindex der Lösung
R= Partikelradius
K_B= Boltzmann Konstante
p= Viskosität der Lösung
K_S= Streulichtvektor
T= absolute Temperatur
λ= Wellenlänge des Laserlichtes
θ= Winkel der Streulichtmessung (hier : 90°)
D= Diffusionskoeffizient des Partikels

Die Partikelgröße (R) kann aus der Stokes Einstein Beziehung berechnet werden, wenn T_C (wird gemessen) bekannt ist.

4.8.2.3. Elektronenmikroskopie

EM-Untersuchungen an Hb-Liposomen wurden mit Hilfe der Gefrierbruchmethode durchgeführt. Die Aufnahmen machte PD Dr.Wolburg vom Institut für Pathologie, Uni Tübingen.

4.8.2.4. Struktur-Berechnungen

Zur Größenbestimmung der Hb-Liposomen werden neben Messungen am Nanosizer elektronenmiksoskopische Aufnahmen herangezogen (siehe dort).
Das Innenvolumen wird aus der Menge von eingeschlossenem, radioaktiv markiertem ^{3}H-Inulin bestimmt.
Berechnungen zur Liposomenstruktur, d.h. zur Anzahl der Bilayer pro Liposom und zum Verhältnis von Hämoglobin zu Lipid pro Liposom, werden aus den vorhandenen Meßergebnissen mit Hilfe von Literaturdaten (JOHNSON 1971, HUANG 1978, CORNELL 1980, LICHTENBERG 1981) durchgeführt.

4.8.2.5. Sauerstoff-Dissoziationskurven

Zur Messung der Sauerstoff-Dissoziationskurven von Hb-haltigen Proben (Erys, Hb-Lsgn, Hb-Lipos) wird in einer Mischkammer die Sauerstoffsättigung der Probe entlang eines Sauerstoff-Gradienten photometrisch bei 436nm (Soretbande von Hb) verfolgt. Die Temperatur wird dabei konstant bei 37° C gehalten.

Für einen vorgegebenen Sauerstoffpartialdruck pO_2 in der Meßkammer und anschließender kontinuierlicher Zufuhr von N_2-Gas kann die Abnahme des pO_2 pro Zeiteinheit berechnet werden, wenn das Kammervolumen V_k und das einströmende N_2-Gasvolumen pro Zeiteinheit bekannt sind.

Dabei ist die Abnahme des pO_2 pro Zeiteinheit in der Mischkammer mit dem Volumen V_k gleich der Abnahme des O_2-Gasvolumens pro Zeiteinheit bei vorgelegtem pO_2 :

$$\frac{dp}{dt} V_k = p \frac{dV_{O_2}}{dt} \qquad (1)$$

Da die Abnahme des O_2-Gasvolumens einhergeht mit der Zunahme des N_2-Gasvolumens, gilt :

$$-\frac{dp}{dt} V_k = p \frac{dV_{N_2}}{dt} \quad \text{bzw.} \quad -\frac{dp}{p} = \frac{dV_{N_2}}{V_k} \qquad (2)$$

Nach Integration der Gleichung (2) von pO_{2a} (= vorgelegter pO_2) bis pO_{2e} (= pO_2 am Ende der Messung) und entsprechend von $V_{N2} = 0$ (am Anfang der Messung) bis V_{N2} (N_2-Gasvolumen am Ende der Messung) erhält man :

$$\ln p = \ln p_o - \frac{V_{N_2}}{V_K} \qquad (3)$$

Da sowohl das N_2-Gas als auch das O_2-Gas durch ein Wasserbad geleitet werden (s.Abb. 9), muß der herrschende Wasserdampfdruck bei 37° C in der Kammer berücksichtigt werden.

Außerdem hängt der pO_2 vom Sauerstoffgehalt des oxygenierenden Gases (C_{O_2}) und dem herrschenden Luftdruck ab. pO_2 berechnet sich demnach wie folgt :

$$p_o = \left[p(Luft) - p(H_2O)\right] \cdot C_{O_2} \qquad (4)$$

Mit Gleichung (3) kann, unabhängig von der Zeit, für jedes injizierte N_2-Gasvolumen der aktuelle pO_2 innerhalb der Meßkammer berechnet werden.

Für die Berechnungen zur Erstellung einer ODC, des zugehörigen p(50)-Wertes, des Hill-Koeffizienten und der Sauerstoff-Freisetzungskapazität stand ein dafür entwickeltes Computerprogramm zur Verfügung.

Die Arbeitsweise des Erythrox-Gerätes ist in Abb.10 noch einmal verdeutlicht.

Die Hb-Liposomen werden vor der Messung durch Druckdialyse (1 atü N_2) auf etwa 1/10 des ursprünglichen Volumens aufkonzentriert.

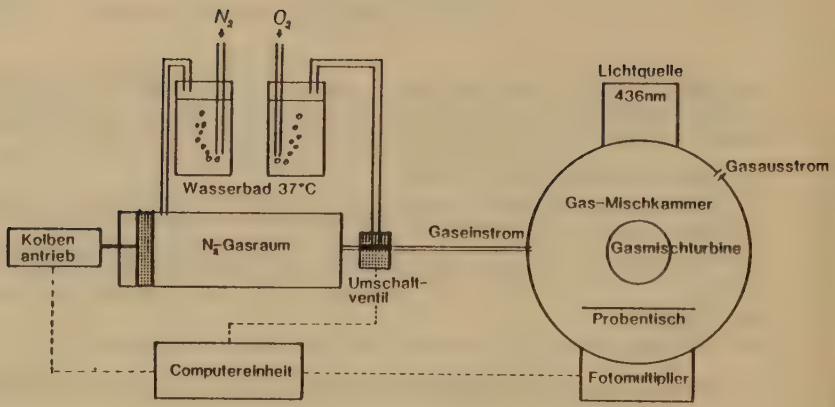


Abb.9 Erythrox-Apparatur

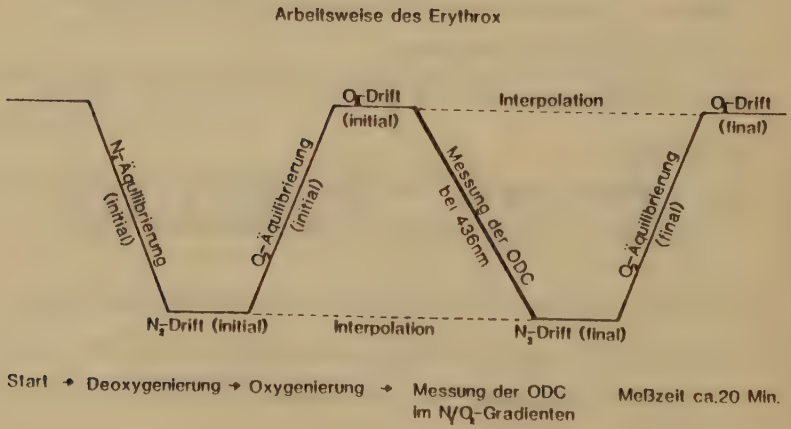


Abb.10 Schematische Darstellung der Vorgänge in der Mischkammer des Erythrox während einer Messung

4.8.3. Lagerstabilität

Je 5 ml radioaktiv markierte Liposomen werden 5 Wochen lang bei RT, 4°C und -20° C aufbewahrt. Am 1., 3., 20. und 35. Tag werden 500 µl der entsprechenden Probe säulenchromatographisch untersucht (Sepharose 4B-Cl, K 9/60). Das Eluat wird in 0.5 ml Fraktionen aufgefangen und am ß-Counter ausgewertet. Die quenchbereinigte Aktivität wird gegen das Elutionsvolumen aufgetragen.

4.8.4. Wechselwirkungen mit Heparin

Um auf schädliche Wechselwirkungen von Heparin mit radioaktiv markierten Lecithin-Liposomen bzw. Hb-Liposomen zu prüfen, werden diese in Mischungen von 20, 50, 100 und 150 IE Heparin in isotonem Phosphatpuffer I eine Stunde inkubiert und nach der UZ-Methode aufgearbeitet (s.4.9.1.). Aus dem Überstand wird die Radioaktivität bestimmt, das Pellet im Puffer resuspendiert und eine S-Wert Bestimmung durchgeführt.

4.9. in vitro und in vivo Versuche

4.9.1. Ultrazentrifugenmethode

Die Membranstabilität von unilamellaren Lecithin-Liposomen (^{3}H-Inulin-^{14}C-Lecithin-markiert) und multilamellaren Hb-Liposomen (^{3}H-Lecithin-^{14}C-Hb-markiert) wird nach einer Methode von SCHUBERT (1983) unter dem Einfluß von Vollblut, Serum (Fibrinogen frei) und verschiedenen Serumproteinen getestet. Die einzelnen Proteine werden in ihren physiologischen Konzentrationen eingewogen (HITZIG 1977). Diese Stammlösungen werden 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 und 1/64 verdünnt und im Test eingesetzt (s.Tab. 1 u. Abb.11).
Je 500 µl einer Probe werden mit 500 µl Hb-Liposomen bzw. Lecithin-Liposomen (Lipid-Konzentration : 2 µM/ml) 30 Minuten inkubiert, mit 1 ml isotonischem Phosphatpuffer I versetzt und 3 Stunden bei 40000 rpm (Beckman 50.3 Ti) zentrifugiert. 500 µl des radioaktiven Überstandes werden mit dem Quenchprogramm (s.4.6) ausgewertet. Als 100%-Werte dienen 200 µl des Überstandes vor der Zentrifugation, als Nullwert ein Liposomen-Ansatz in reinem Phosphatpuffer I (500 µl des Überstandes nach Zentrifugation). Die Menge der Radioaktivität im Überstand ist ein Maß für die membranzerstörende Wirkung der eingesetzten Proben bzw. ein Indikator für die Stabilität der verwendeten Liposomen.

Protein	Einwaage mg/ml
Albumin,rein	40,0
Cohn V	40,0
Cohn IV-1	11,0
α_2-Makroglobulin	2,85
α_2-Haptoglobin	1,1
Cohn IV-4	11,4
Cohn III	11,4
β_1-Siderophilin Transferrin	2,6
Cohn II	17,5
IgG	13,0
Serum	73,0
Vollblut	n.b.

Tab.1 siehe Text

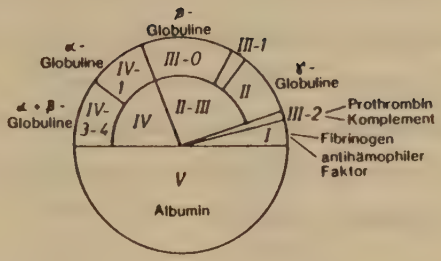


Abb.11 Cohn-Kreis (STRAUB 1960)

4.9.2. Leberperfusionen

400-500 g schwere Exbreeder-Ratten werden i.p. mit Nembutal (0.5-1.0 ml) anaesthesiert. In die freigelegte Vena femoralis werden ca.550 IE Heparin injiziert. Danach wird das Tier nach einer von TYRRELL (1977) beschriebenen Methode operiert. Das Abdomen wird eröffnet und um die Vena cava inferior und die Vena portae werden Ligaturen gelegt. Durch eine Braunüle wird in die Vena portae HBSS-Lösung eingepumpt (Pumpgeschwindigkeit 4-5 ml/Min) und, nach einem Schnitt durch die Vena cava unterhalb der Ligatur die Leber durchspült, bis sie blutfrei erscheint.

Dann wird das Diaphragma durchschnitten, das Sternum entfernt und die Vena cava superior durch das rechte Atrium an einer Braunüle fixiert. Die Vena cava inferior wird abgebunden, die HBSS-Lösung jetzt durch die Vena cava superior geleitet und die Durchflußrate auf 8 ml/Min eingestellt (Fließrichtung : V.cava inf. nach V.portae).
Nachdem die Leber freipräpariert ist, wird sie in der Perfusionskammer bei 37° C an das jeweilige Liposomenmedium angeschlossen und perfundiert (s.Abb.12).

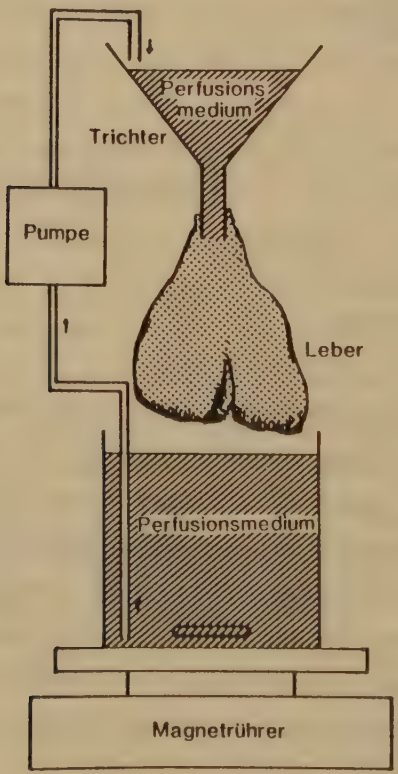


Abb.12 Leberperfusions-Apparatur

Stammlösung (HBBS, pH=7.35) :	NaCl	8.0 g/l
	KCl	0.4 g/l
	$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	60 mg/l
	KH_2PO_4	60 mg/l
	$Mg_2SO_4 \times 7\ H_2O$	0.2 g/l
	$CaCl_2$	0.14 g/l
	Glucose	1.0 g/l
	Na_2HCO_3	0.35 g/l

Perfusionslösung : 100 ml Stammlösung +
900 ml Aqua bidest
pH-wert = 7.35

Nach 0, 5, 7, 9, 11, 15, 20, 30, 45 und 60 Minuten wird 1 ml Liposomenmedium aus dem Vorratsgefäß entnommen und ausgewertet. Mit 500 µl wird mittels der UZ-Methde (s.4.9.1.) auf die Intaktheit der Liposomen geprüft, der Rest wird am ß-Counter ausgezählt. Die Abnahme der Radioaktivität im Perfusionsmedium wird gleichgesetzt mit der Aufnahme von Liposomen in die Leber.
Um zu gewährleisten, daß die Leber vollständig mit Perfusionsmedium durchspült ist, werden erst nach 5 Minuten Perfusionszeit (8 ml/Min) die Proben entnommen.
Die spezifische Aktivität (dpm/mg) von Lecithin bzw. Hb im Perfusionsmedium wird bestimmt und die Aufnahme in die Leber berechnet.

4.9.3. Biolumat-Tests

Wenn Makrophagen bzw. neutrophile Granulocyten phagocytieren, entstehen u.a. Sauerstoffradikale. Es kommt zur Ausbildung von angeregten Zuständen des Sauerstoffmoleküls. Bei der Rückkehr dieser angeregten Zustände in den Grundzustand (Triplett-Zustand, Hundsche Regel) emmitiert das Molekül Photonen (Biolumineszenz).
Als analytische Methode für die Phagocytose durch Granulocyten bzw. Makrophagen kann deshalb die Biolumineszenz-Messung herangezogen werden.
Sie ermöglicht qualitative und quantitative Aussagen über die Kapazität und Stimulierbarkeit des oxidativen Metabolismus neutrophiler Granulocyten bzw. Makrophagen und gilt als Maß für ihre Phagocytoseaktivität.
Die Messung erfolgt nach einer Methode von BRUCHELT und SCHMIDT (1984). Für die Auswertung der Biolumineszenz steht ein Computerprogramm LB 9505 zur Verfügung.

Granulocyten-Isolierung :

Für die Isolierung nach einer Methode von HJORT (1981) wird ein zweistufiger Percoll-Dichtegradient hergestellt:

1.Stufe Percoll 70%	70 ml 100%iges Percoll 30 ml isotonische NaCl-Lsg Brechungsindex = 1.3477
2.Stufe Percoll 55%	55 ml 100%iges Percoll 45 ml isotonische NaCl-Lsg Brechungsindex = 1.3450

1 ml 70%iges Percoll wird mit 55%igem Percoll vorsichtig überschichtet. Nach Auftragung von 500 µl frisch entnommenem EDTA-Blut wird 10 Minuten bei 1400 rpm (300g) zentrifugiert (Zentrifuge ohne Bremse auslaufen lassen).

Zwischen den beiden Stufen bildet sich ein Granulocytenring aus, der nach Absaugen der oberen Stufe mit einer Pasteurpipette aufgenommen wird (s.Abb.13). Die Zellen zweimal mit 10 ml isotoner Kochsalzlösung gewaschen und jeweils 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Das Pellet wird in isotonischem Phosphatpuffer I resuspendiert und die Lösung auf 0.3 x 10^6 Zellen/ml eingestellt (Zellzahlbestimmung am Cellcounter 134 Analys Instrument).

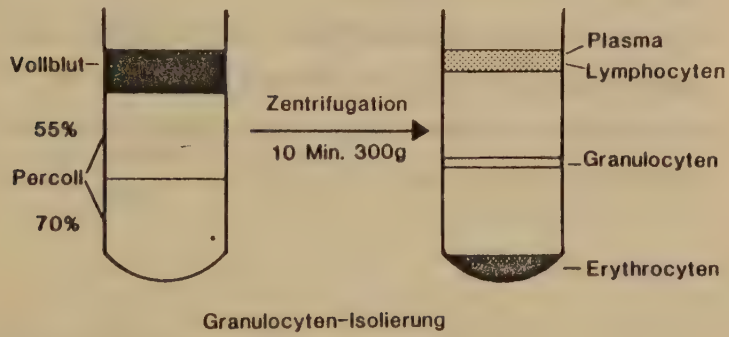


Abb.13 Granulocyten-Gewinnung mittels Percollgradienten-Zentrifugation

Testansatz :

500 µl Phosphatpuffer I
100 µl Zellsuspension (0.3 x 10^6 Zellen/ml)
50 µl 20%iges Lumanol 100 (3-Aminophtalhydrazid, LUMAC)

10 Minuten bei 37° C inkubieren, dann

20 µl Probe
20 µl Serum (je nach Testansatz)

Die Meßzeit wird auf 70 Minuten eingestellt.

Als Granulocyten-Funktionstest wird eine Messung mit 5 µl opsonisiertem Zymosan A (aus S.cerevisiae Hefe, Sigma) anstelle von Serum und einer Probe durchgeführt.
Da zu hohe Hb-Liposomenkonzentrationen einen Quencheffekt und zu niedrige Serumkonzentrationen im Testansatz eine zu geringe Aktivitätsausbeute zeigen, wird das Testsystem auf diese beiden Konzentrationsparameter optimiert (s.Abb.14u.15).

Makrophagen-Isolierung :

Es werden Alveolarmakrophagen der Ratte verwendet. Die Isolierung erfolgt nach einer Methode von TRUSH (1979).
Ein Ratte wird mit Nembutal (0.1 ml/100g Kg) narkotisiert und die Trachea freigelegt. Das Tier entblutet indem das Abdomen eröffnet und die Abdominalaorta durchtrennt wird.
Die Lunge wird über eine in der Trachea fixierten Braunüle mit 8 ml Phosphatpuffer I mehrmals gewaschen. Dieser Vorgang wird ca. zehnmal

wiederholt. Die Lavages werden gepoolt und bei 18° C 10 Minuten bei 120g zentrifugiert.

Man gewinnt auf diese Weise eine reine Makrophagenpopulation (Lichtmikroskopische Kontrolle). Das Pellet wird in 1 ml Phosphatpuffer I aufgenommen, die Zellzahl ermittelt und auf 0.3 x 10^6 Zellen/ml eingestellt.

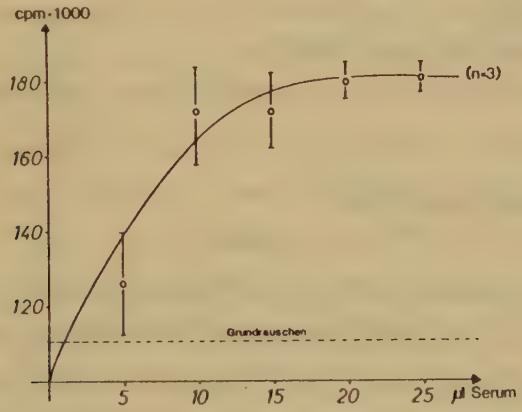


Abb.14 Biolumineszenz-Ausbeute in Abhängigkeit von der Serummenge im Testansatz

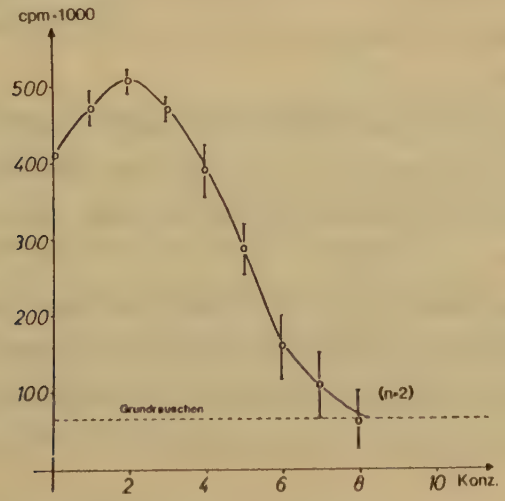


Abb.15 Biolumineszenz-Ausbeute in Abhängigkeit von der Hb-Liposomen-Konz. im Testansatz wobei 0=250 1=125 2=63 3=31 4=16 5=8 6=4 7=2 und 8=1 µg Lec/ml Testansatz bedeuten

Testansatz :

500 µl Phosphatpuffer I
100 µl Zellsuspension (0.3 x 10^6 Zellen)
50 µl Lumanol

10 Minuten bei 37° C inkubieren, dann

20 µl Probe
20 µl Serum (je nach Testansatz)

Die Biolumineszenz wird in cpm gegen die Meßzeit aufgetragen.

4.9.4. Immunologische Tests

Im Tierversuch werden 500 g schwere Exbreeder-Ratten in vier Gruppen zu jeweils drei Tieren eingeteilt. Alle Tiere erhalten unter Äthernarkose eine intraperitoneale Injektion von 0.5 ml einer entsprechenden Lösung.

Die erste Boosterung mit 0.5 ml i.p. erfolgt am 3.Tag, die zweite am 8.Tag und die letzte Boosterung mit 0.2 ml erfolgt am 15.Tag nach der ersten Injektion.

Gruppe A erhält Hb-Lösung (38 mgHb/ml), Gruppe B reine Lecithin-Liposomen (8 mgLec/ml), Gruppe C erhält Hb-Liposomen (4,7 mgHb/ml, 8 mgLec/ml) und Gruppe D (Kontrollgruppe) isotonischen Phosphatpuffer I.

Nach 17 Tagen werden aus der Schwanzvene Blutproben entnommen und ein hämolysefreies Serum gewonnen. Das Serum wird nach einer Methode von OUDIN (1952) mit 2%igen Agarose-Gelen in ein Reagenzglas eingebettet und mit der entsprechenden Antigen-Lösung (Hb-Lsg., Hb-Lipos.,

Lec-Lipos., Phosphatpuffer) überschichtet.

4.9.5. Plasmaeliminationen

Die Injektion von 1 ml radioaktiv markierten Liposomen (^{3}H-Inulin-^{14}C-Lec-Lipos und ^{14}C-Hb- ^{3}H-Lec-Lipos) in 500 g schwere, männliche Sprague Dawley Ratten erfolgt in die freigelegte Vena femoralis. Die Tiere werden vorher i.p. mit Nembutal (0.1 ml/100 gKg) narkotisiert.
Zeitabhängige Plasmaeliminationsraten der Liposomen werden durch jeweils 0.5 ml Blutentnahme aus der lateralen Vena femoralis bestimmt. Das Blut wird dazu in 1.5 ml Eppendorf-Cups 5 Minuten bei 8000g (Eppendorf Zentrifuge) zentrifugiert und 100 µl des Serumüberstandes ausgezählt. Die verbleibenden Erythrocyten werden zweimal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und auf radioaktive Kontamination überprüft.

4.9.6. Organaufnahme

Sieben Exbreeder-Ratten erhalten radioaktiv markierte Hb-Liposomen über die Vena femoralis (s.4.9.5.).
Nach 5, 7, 9, 15, 20, 30 und 45 Minuten werden die Tiere getötet und die Organe Lunge, Niere, Leber und Milz entnommen.
Leber und Lunge werden mit Phosphatpuffer I durchspült, Niere und Milz im Puffer gewaschen. Die Organe werden gewogen und dann gepottert. Ein Aliquot wird mit 10 M NaOH hydrolysiert, mit H_2O_2 und Eisessig versetzt und dann ausgezählt.

Die dpm/ml (s.4.6.) werden auf das Gesamtorgan umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen.

Die Kontamination der Organe mit Serum wird bei der Auswertung berücksichtigt (GREGORIADIS 1974, HWANG 1980).

5. RESULTATE

5.1. Charakterisierung des Hämoglobins nach Isolierung

Es konnte in gut reproduzierbarer Weise Hämoglobin aus Erythrocyten gewonnen werden, das im Folgenden näher charakterisiert wird.

5.1.1. Isoelektrische Fokussierung

Aus Hb-Lysat konnte ein gelchromatographisch sauberes Hämoglobin isoliert werden, das neben einer schwachen $\alpha_2\delta_2$-Bande geringe Anteile an MetHb bzw. den halboxydierten Formen $\alpha_2{}^+\beta_2$ und $\alpha_2\beta_2{}^+$ zeigte. Serumproteine wurden in der gereinigten Hb-Probe nicht mehr nachgewiesen (s.Abb.16).

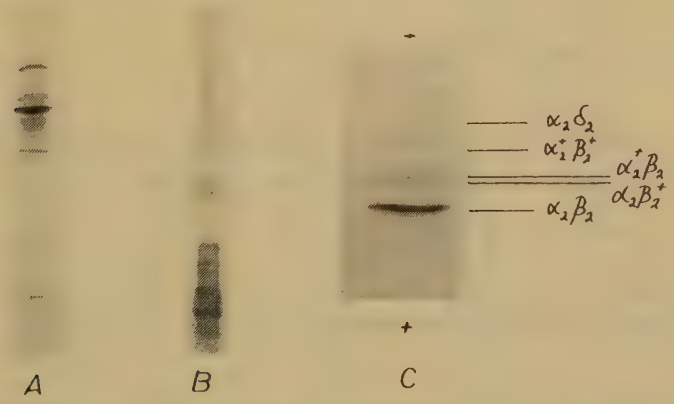


Abb.16 IEF im Bereich von pH 3.5-9.5
A: Hb-Lysat B: Serum C: gereinigtes Hb (vergrößert)

5.1.2. Gaschromatographie

Bei einer Nachweisgrenze von 10 ng/µl wurden keine Lipide aus Erythrocyten-Membranen mehr nachgewiesen.

5.1.3. S-Wert-Bestimmungen

Der S-Wert von 4,30 ± 0,5 (bei 20° C in Phosphatpuffer I) entsprach dem Literaturwert von S=4,31 (Svedberg-Bedingungen : 20° C in H_2O).

5.1.4. Säulenchromatographie

Aus der Eichkurve (s.Abb.17) ergab sich für das gereinigte Hb ein Molekulargewicht von ca. 68000 Daltons (Lit.-Wert : 64458). Der Anteil an 2,3-DPG im Hb-Molekül wurde dabei nicht bestimmt.

5.1.5. Sauerstoff-Dissoziationskurven

Die mittlere ODC ist in Abb.18 dargestellt. Der p(50)-Wert betrug 18,6 ± 5,5 mmHg, der Hillkoeffizient 2.02 ± 0,13 und die ORC 12,4 ± 4,7% (n = 25).

5.1.6. Spektrophotometrie

Der Anteil an HbO_2, Hb und MetHb kann aus Abb.19 entnommen werden. Die angegebenen Mittelwerte schwanken um ± 4% (n = 20).

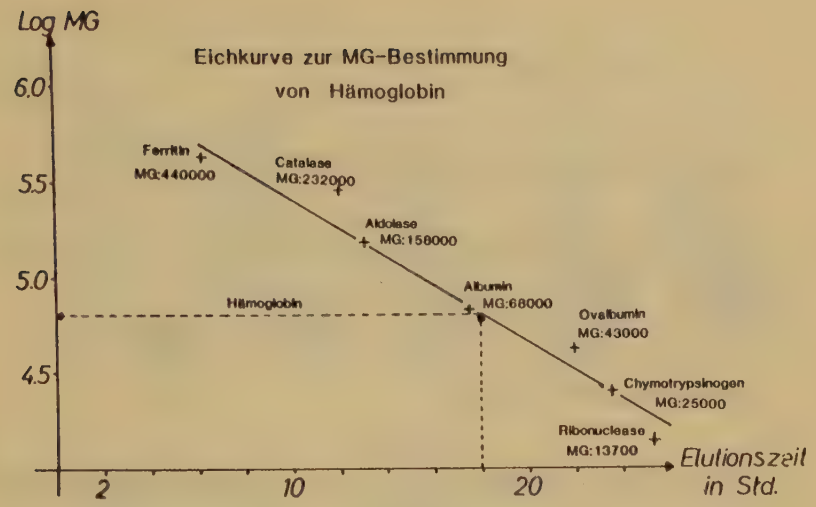
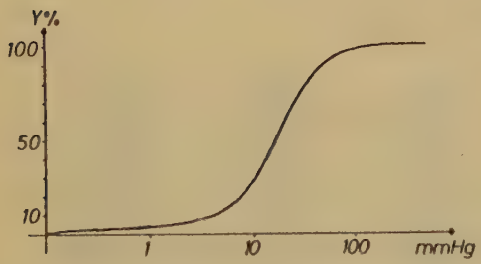


Abb.17 Sephacryl S-300 K12/150 Säule
Elutionspuffer: Phosphatpuffer I
Auftragsvolumen: 0.5 ml, Elutionsgeschw.: 30 ml/h



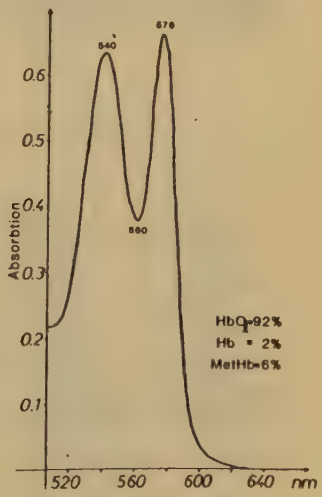


Abb.18 ODC der gereinigten Hb-Lösung

Abb.19 Spektrum der gereinigten Hb-Lösung

5.1.7. Lagerstabilität

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abb.20 und 21 dargestellt.
Standardabweichungen fehlen, da die Messungen nur einmal durchgeführt wurden.

5.1.8. Emulgator-Inkubationen

Eine dreistündige Inkubation von n-Octyl-GP (200mg/8ml Hb-Lsg.) mit Hb zeigte keinerlei Veränderungen im S-Wert, in der IEF und im MG. Die ODC bzw. der p(50)-Wert, der Hill-Koeffizient und die ORC unterschieden sich nicht von der reinen Hb-Lösung.
Bei Inkubationen mit Cholat (100mg/8ml Hb-Lsg.) denaturierte das Hb nach 3 Std. und fiel zum größten Teil aus.

5.2. Hämoglobin-Liposomen

Um Hämoglobin in Liposomen einzuschließen, wurden vier Verfahren gewählt, die sich in der Herstellung von Liposomen grundsätzlich unterscheiden. Nur eine dieser Methoden führte zu befriedigenden Ergebnissen, nämlich die Durchfluß-Dialyse-Methode nach MILSMANN (1978). Mit ihr ist es außerdem möglich, praktisch ohne Materialverlust zu arbeiten, d.h., nicht eingeschlossenes Hämoglobin kann im Recycling wiedergewonnen werden.

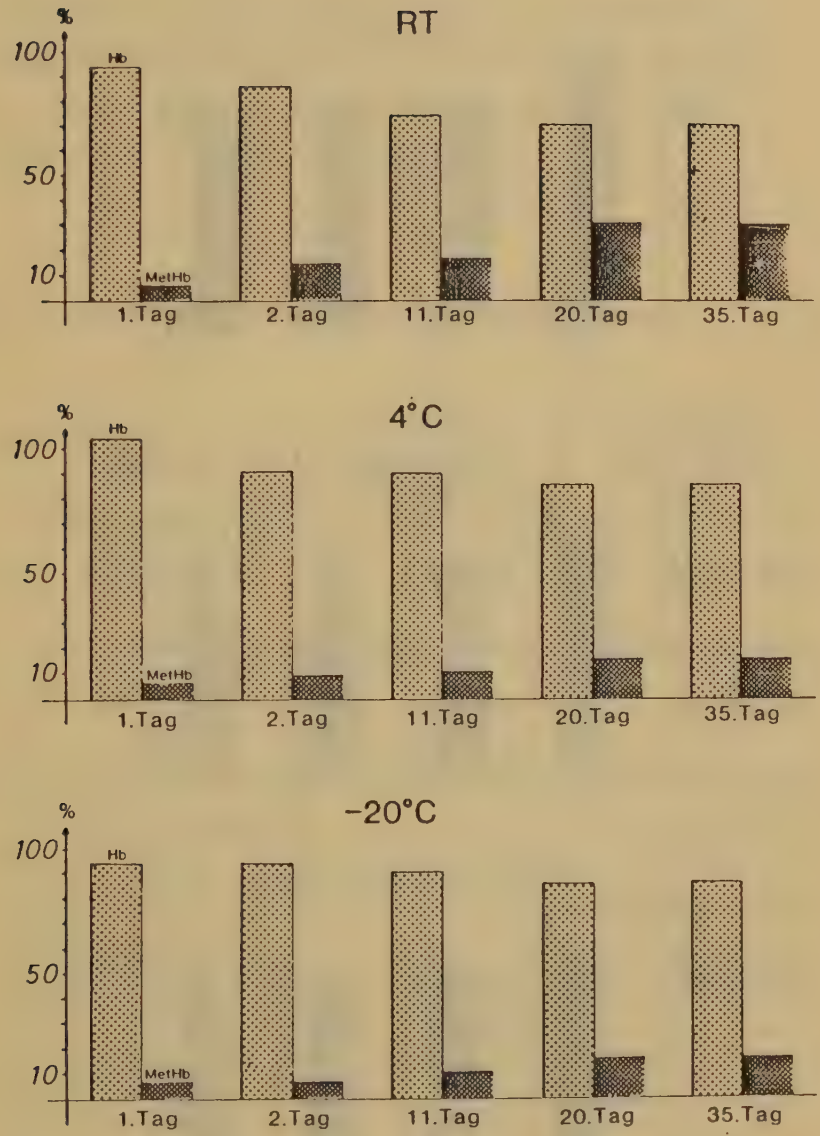


Abb.20 Abhängigkeit des MetHb-Gehaltes in der gereinigten Hb-Lösung in Abhängigkeit von der Lagertemperatur

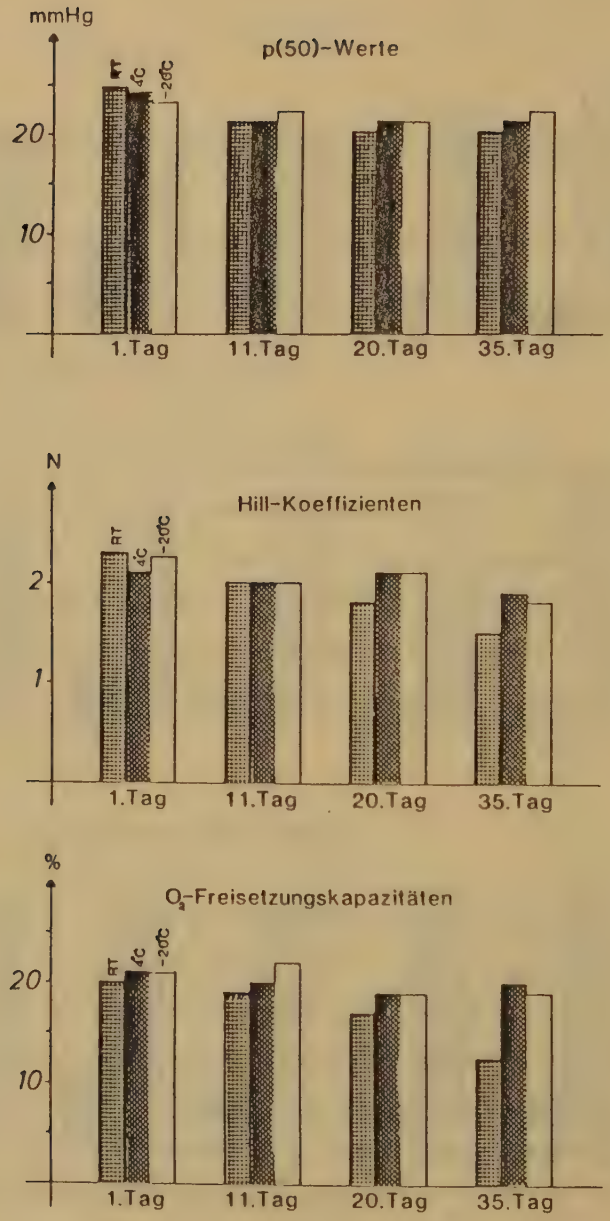


Abb.21 Daten aus Sauerstoffdissoziationskurven von gereinigten Hb-Lösungen während der Lagerung

Eine Größenbestimmung der Liposomen anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Messungen am Nanosizer wurden nur mit Hb-Liposomen nach der Dialyse-Methode durchgeführt. Liposomen aus anderen Präparationen, bei denen kaum Hb eingeschlossen werden konnte, wurden nicht näher charakterisiert.

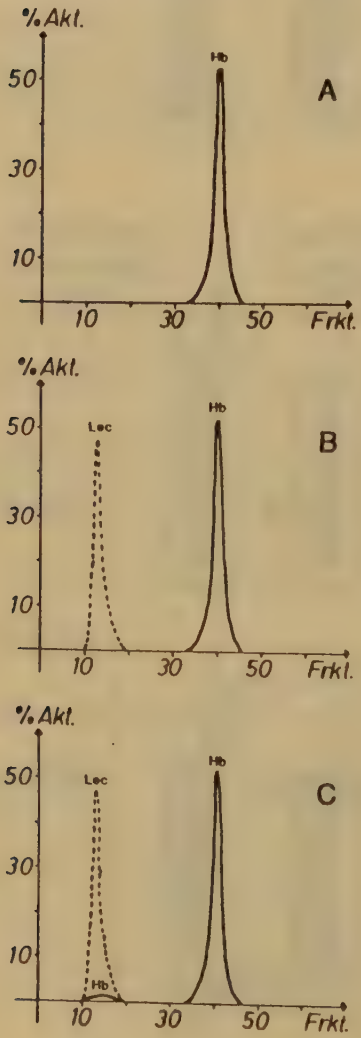
5.2.1. Ergebnisse der verschiedenen Präparationsmethoden

Methode	maximaler Hb-Einbau in %	maximaler Lipid-Einbau in %
Handshaken/ Ultraschall (n=5)	2,4 ± 1,3	97,0± 3,0
Gelfiltration (n=3)	1,0± 0,6	13,0± 2,0
Ätherinjektion (n=5)	n.b.	26,0± 5,0
Durchfluß-Dialyse (n=25)	25,0± 4,0	95,0± 3,0

Tab.2 Zusammenfassung der verschiedenen Liposomen-präparationsmethoden , n.b. = nicht bestimmbar

Säulenchromatographische Elutionsdiagramme verdeutlichen noch einmal den Einschluß an Hb in Lecithinliposomen.

Handshaken/Ultraschall



A : 15 sek/3min beschallt
keine Liposomenbildung

B : 30 sec/3min beschallt
Lec-Liposomen ohne nachweisbaren Hb-Einschluß

C : 1 min/3min beschallt
Lec-Liposomen mit 2.4% Hb-Einschluß

Abb.22 Sepharose 4B-Cl K26/90 Säule
Elutionspuffer: Phosphatpuffer I

Gelfiltration

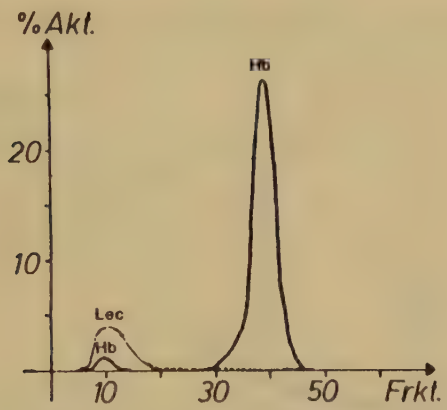


Abb.23 Sepharose 4B-Cl K26/90 Säule
Elutionspuffer: Phosphatpuffer I
Elutionsgeschwindugkeit: 30 ml/h
13% Lecithin und 1.6% Hb im "Liposomenpeak

Ätherinjektion

Bei dieser Methode fiel ca. 90% der eingesetzten Hb-Menge aus. Die Liposomenausbeute war mit knapp 30% der eingesetzten Lecithine sehr gering und ein Hb-Einbau in die Liposomen nicht meßbar.

Durchfluß-Dialyse

Nach diesem Verfahren wurden alle weiteren Liposomen hergestellt (s.Abb.24).

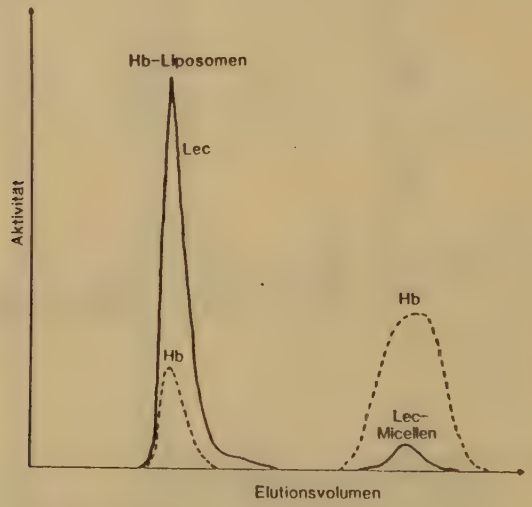


Abb.24 Sepharose 4B-Cl K26/90 Säule
Elutionspuffer: Phosphatpuffer I
Elutionsgeschwindigkeit: 30 ml/h
95% Lecithin und 25% Hämoglobin im "Liposomenpeak"

Als Emulgator wurde nur noch n-Octyl-GP verwendet, als Phospholipid ausschließlich Lecithin mit einer Zusammensetzung von 38% Palmitinsäure (16:0), 12% Stearinsäure (18:0), 30% Ölsäure (18:1), 14% Linolsäure (18:2), 3% Arachidonsäure (20:4) und 3% sonstigen Fettsäuren (gaschromatographische Bestimmung der verwendeten Lecithin-Chargen).

Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 150ml Dialysat pro Stunde betrug die Dialysezeit 10 Stunden (s.Abb.25).

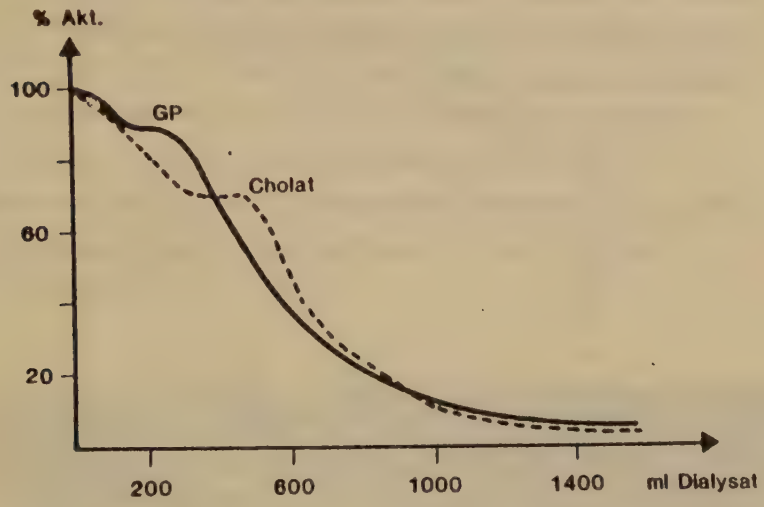


Abb.25 Entfernen der Emulgatoren n-Octyl-GP und Cholat aus der Dialysekammer

Das Ende der Plateaus in den Dialysekurven markiert den Zeitpunkt, an dem die Liposomenbildung abgeschlossen ist. Danach wird der Emulgator kontinuierlich abgezogen. Der Restgehalt von 0,72% n-Octyl-GP bzw. von 0,67% Cholat konnte säulenchromatographisch abgetrennt werden.
Eine Oxydation der Fettsäuren während der Liposomenpräparation fand nicht statt (GC-Analyse).

Die Untersuchungen brachten zwei Ergebnisse :

-unter Verwendung von n-Octyl-GP als Emulgator sind Hb-Liposomen mit mehr als 12% Cholesterin in der Membran nicht möglich (s.Abb.26)

-die Hb-Einbaurate in Lecithin-Liposomen nimmt mit steigendem Cholesterin-Gehalt ab (s.Abb.27)

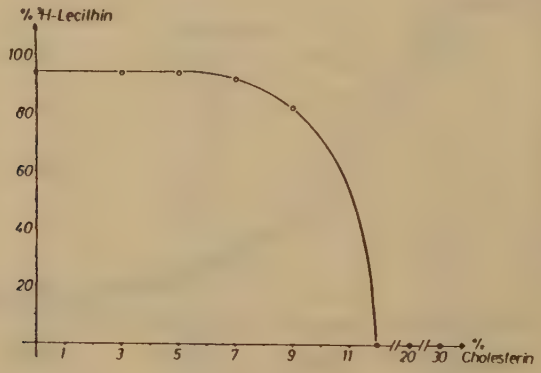


Abb.26 Bildung von Hb-Liposomen in Abhängigkeit vom Cholesterin-Gehalt

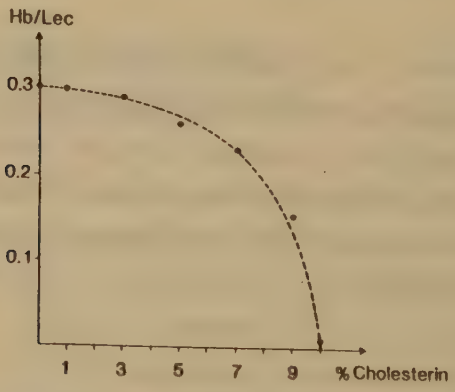


Abb.27 Hb-Einbaurate in Abhängigkeit vom Cholesteringehalt

5.2.3. Größe und Struktur der Hb-Liposomen

Die Rechromatographie der Hb-Liposomen über eine Sepharose 2B-Cl-Säule ergab einen scharfen Peak im Ausschlußvolumen der Säule (s.Abb.35A), der neben Elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Homogenität der Liposomen verdeutlicht. Aus den Aufnahmen läßt sich ebenfalls entnehmen, daß die Hb-Liposomen Multilayer-Strukturen in der Membran besitzen und einen mittleren Durchmesser von 2000Å aufweisen (s.Abb.28a,b).

Abb.28 Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit Hilfe der Gefrierbruchmethode
links: Hb-Liposomen 1 cm = 2000 Å
rechts: Darstellung der multilamellaren Struktur

Dieser Wert konnte auch durch Nanosizer-Messungen bestätigt werden, wobei die Polydispersität = 1 betrug (Die Polydispersität wird als Maß der Homogenität der Hb-Liposomencharge verstanden (PD von 0-9), dabei bedeutet 0 = sehr homogen, 9 = sehr heterogen).
Es ergibt sich ein Außenradius von 1000Å. Der kleinstmögliche Innenradius wird durch die Krümmung des innersten Layers bestimmt. Er wird mit Ri=59.2Å angenommen. Da nach Berechnungen von CORNELL (1980) die Dicke eines Bilayers (BD) 45.8Å beträgt (s.Abb.29), berechnet sich die theoretische Anzahl der Bilayer pro Liposom nach

$$\frac{R_a - R_i}{BD} = \frac{1000 - 59,2}{45,8} = 20,5 \qquad (1)$$

also auf ca. 21 Bilayer pro Liposom.

Das mit radioaktivem Inulin markierte Innenvolumen ergab einen Innenradius von 425Å und damit eine Bilayerzahl von 13. Allerdings konnte der mögliche Einschluß von Inulin in die Hydratschichten zwischen den Bilayern (s.Abb.1) nicht bestimmt werden, wodurch ein zu großes Innenvolumen vorgetäuscht und damit eine zu kleine Bilayerzahl ermittelt wird.

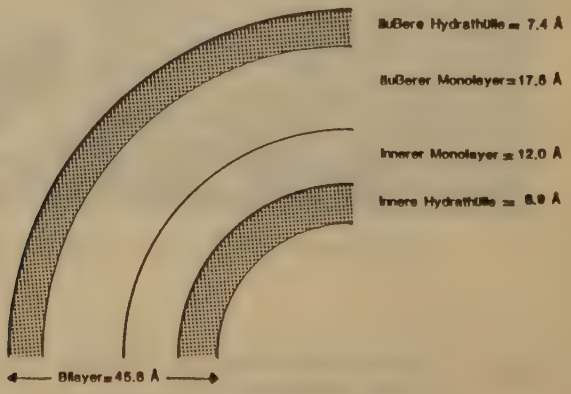


Abb.29 Ausschnitt aus einer Liposomenmembran nach einem Modell von CORNELL

Berechnet man nun nach dem Modell von CORNELL (1980) die Radien bzw. die Oberflächen der einzelnen Layerschichten, so erhält man folgende Formeln

$$r_{an} = R_i + n \cdot BD - 7{,}4 \qquad (2)$$

$$r_{in} = R_i + (n-1) \cdot BD + 8{,}9 \qquad (3)$$

$$O_{an} = r_{an}^2 \cdot 4\pi \qquad (4)$$

$$O_{in} = r_{in}^2 \cdot 4\pi \qquad (5)$$

wobei n = 21 (Anzahl der Bilayer)

Unter der Vorraussetzung, daß ein Lipidmolekül im äußeren Layer 72.2Å und im inneren Layer 73.7Å einnimmt, kann man die Anzahl der Lipidmoleküle in den äußeren bzw. inneren Layern berechnen

$$L_{an} = \frac{O_{an}}{72{,}2} \qquad L_{in} = \frac{O_{in}}{73{,}7} \qquad (6)\ (7)$$

Die Summe aller Lipidmoleküle pro Liposom beträgt dann

$$\sum_{n=1}^{21} L_{an} + L_{in} = 2{,}51 \cdot 10^6 \qquad (8)$$

Bei einem effektiven Einsatz von 129 µMol pro Ansatz (95% Einbaurate in die Liposomen; 136 µMol = 100%) ergibt sich durch Multiplikation mit der Zanl von Avogadro die Gesamtzahl der Lipidmoleküle pro Ansatz

$$6{,}023 \cdot 10^{23} \cdot 1{,}29 \cdot 10^{-4} = 7{,}78 \cdot 10^{19} \qquad (9)$$

Mit den Gleichungen (8) und (9) läßt sich die Anzahl der Liposomen pro

Präparationsansatz berechnen

$$\frac{\text{Lipid-Moleküle pro Ansatz}}{\text{Lipid-Moleküle pro Liposom}} = \frac{7,78 \cdot 10^{19}}{2,51 \cdot 10^{6}} = 310 \cdot 10^{12}$$

Die eingesetzte Hb-Konzentration von 150mg/ml wurde bei der Lysat-Aufbereitung 1:5 verdünnt, sodaß in einem 8ml-Ansatz 240mg Hb enthalten sind. Bei einer mittleren Einbaurate von 25% Hb in die Liposomen ergibt sich ein Gehalt von 60mg Hb pro Ansatz, bzw. von $1.94*10^{12}$mg Hb pro Liposom.

Ähnlich wie Gleichung (9) läßt sich mit Hilfe des MG von 64500 Daltons eine Zahl von $18.1*10^{3}$ Hb-Molekülen pro Hb-Liposom berechnen. Daraus ergibt sich ein Lipid/Hb Verhältnis von 139, d.h., auf 139 Phospholipidmoleküle in einem Liposom kommt ein Hb-Molekül.

$$\frac{\text{Lipid-Moleküle pro Liposom}}{\text{Hb-Moleküle pro Liposom}} = \frac{2,51 \cdot 10^{6}}{18,1 \cdot 10^{3}} = 139$$

Unter der Annahme, daß die Hb-Konzentration im wässrigen Medium konstant bleibt (30mg Hb/ml Ansatz), berechnet sich eine mögliche Hb-Menge im wässrigen Kompartiment der Liposomen von 7.41mg (Innenvolumen + wässrige Schichten zwischen den Layern = 247 µl). Bei einem Gesamtgehalt von 60mg Hb pro Ansatz entspricht das einem Anteil von 12.4%. Mit anderen Worten, das in den Lecithin-Liposomen vorhandene Hb ist hauptsächlich in die Lipidschicht der Bilayer eingebaut.

Mit den erstellten Daten und einem Hb-Moleküldurchmesser von ca. 50Å läßt sich ein Hb-Liposom-Modell der abgebildeten Form konstruieren (s.Abb.30).

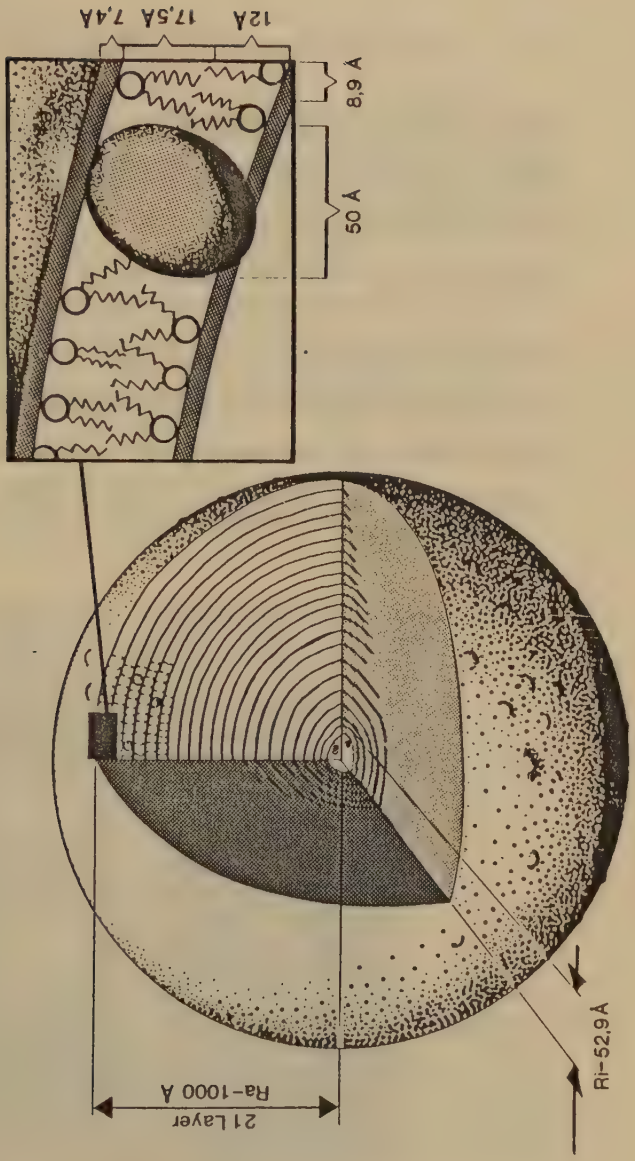


Abb.30 Hb-Liposomen-Modell

5.2.4. S-Wert-Bestimmungen vor und nach Ultrazentrifugation

Radioaktiv markierte ^{14}C-Hb/^{3}H-Lec-Liposomen wurden 90 Minuten bei 50000rpm = 220000g zentrifugiert, der Überstand am ß-Counter gemessen und das Pellet resuspendiert.

S-Wert der Hb-Liposomen vor Zentrifugation = 27,7 $\pm$ 0,5

nach Zentrifugation = 28,3 $\pm$ 1,0 (n=2)

Im Überstand konnte keine Aktivität festgestellt werden.

Die Hb-Liposomen aggregieren demnach nicht, sie bleiben selbst bei hohen g-Zahlen stabil und können wieder resuspendiert werden (s.Abb.31).

Abb.31 Hb-Liposomen in Phosphatpuffer I vor und nach Ultrazentrifugation

5.2.5. Sauerstoff-Dissoziationskurven

Bedingt durch den Verlust an 2,3-DPG von mehr als 30% (modifizierte Phosphatbestimmung nach BARTLETT 1959) während der Dialyse erhöhte sich die O_2-Affinität des Hb, was eine deutliche Linksverschiebung der O_2-Dissoziationskurve zur Folge hatte (s.Abb.32).
Dadurch fiel gleichzeitig die O_2-Freisetzungskapazität (ORC) des Hb von anfangs 23% auf 3% ab (Tab. 3). Mit diesen Daten wurde die noch vorhandene, reale ORC des Hb am Ende der Hb-Liposomenpräparation berechnet

$$\frac{\text{Anteil an } HbO_2 \cdot \text{ORC (nach Präp.)}}{\text{Anteil an } HbO_2 \cdot \text{ORC (vor Präp.)}}$$

wobei HbO_2 = Hb(gesamt) minus MetHb und ORC die O_2-Sättigung bei 95mmHg (Lunge) minus O_2-Sättigung bei 40mmHg (Peripherie) bedeuten. Damit wird die Sauerstoffmenge, die das Hb des frisch gewonnenen Lysats bei einem pO_2 von 40mmHg wieder abgeben kann, während der Liposomenpräparation um mehr als 90% herabgesetzt.

5.2.6. Tocopherol- und 2,3-DPG-Einbau in Liposomen

Mit dem Einbau von 2,3-DPG in die Hb-Liposomen mittels Kurzschlußdialyse (s.4.8.1.4.) war es möglich, die O_2-Affinität des Hb zu günstigeren Werten hin zu verschieben (s.Abb.33).
Mit dem Einbau von Tocopherol in die Liposomenmembran konnte der MetHb-Anteil um mehr als 50% auf 16% reduziert werden (s.Tab. 3).

	ohne						mit Tocopherol + 2,3-DPG		
	VB	LYS	GFL	vD	nD	Lip	vD	nD	i
P (50) mm Hg	24	23	19	15	13	8	22	22	15
N 40–60%	1.7	2.0	2.0	2.0	1.6	1.3	2.0	2.0	1.7
ORC %	23	19	12	9	7	3	18	18	8
Met Hb %	0.5	2	8	28	35	42	11	16	16
Präp. Zeit h	0	1.5	2	5	15	18	5	15	18

Tab.3 Zusammenfassende Übersicht über ODC- und MetHb-Änderungen während der Hb-Liposomen-Präparation

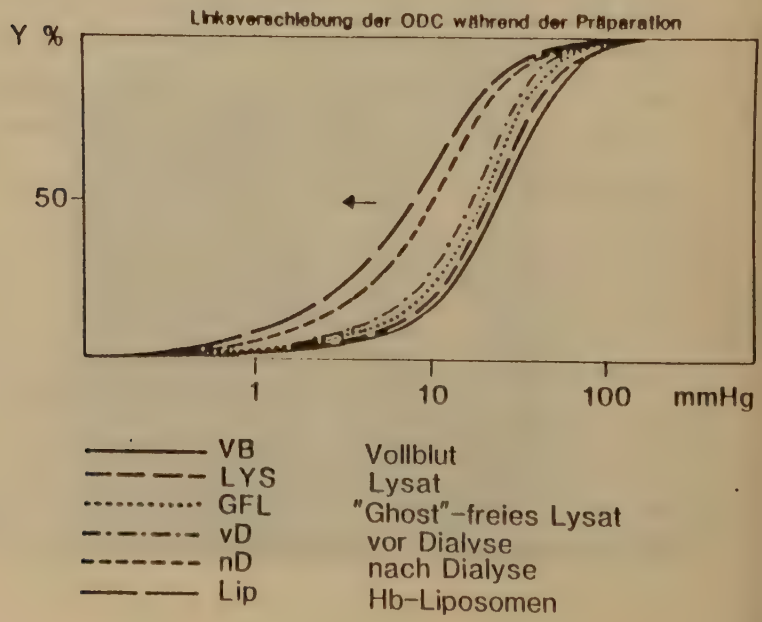


Abb.32

Dadurch erhöht sich die reale ORC, bei der in der Peripherie Sauerstoff abgegeben werden könnte, um mehr als 26% auf ca. 37% (vergl. 5.2.5.).

Eine zusammenfassende Übersicht über die Veränderungen der Hb-Charakteristik während einer Hb-Liposomenpräparation mit und ohne Tocopherol und 2,3-DPG Einbau zeigt Abb.34. Diese Werte aus n=20 Messungen schwanken mit einer Standardabweichung um $\pm$ 10%.

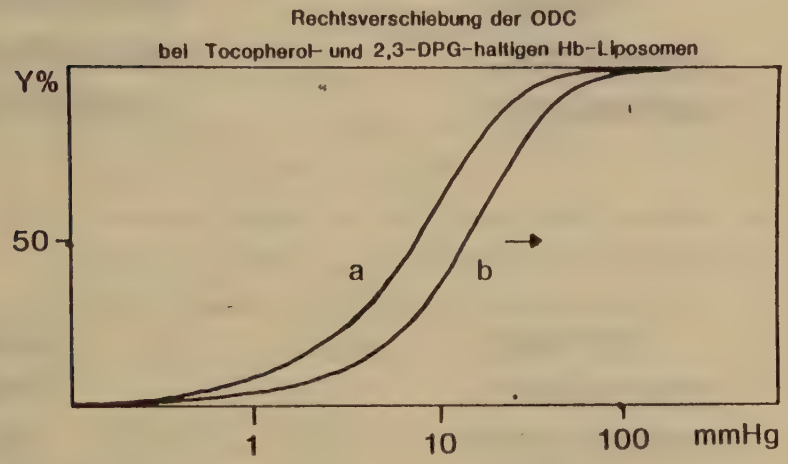


Abb.33 a: ohne b: mit Tocopherol und 2,3-DPG

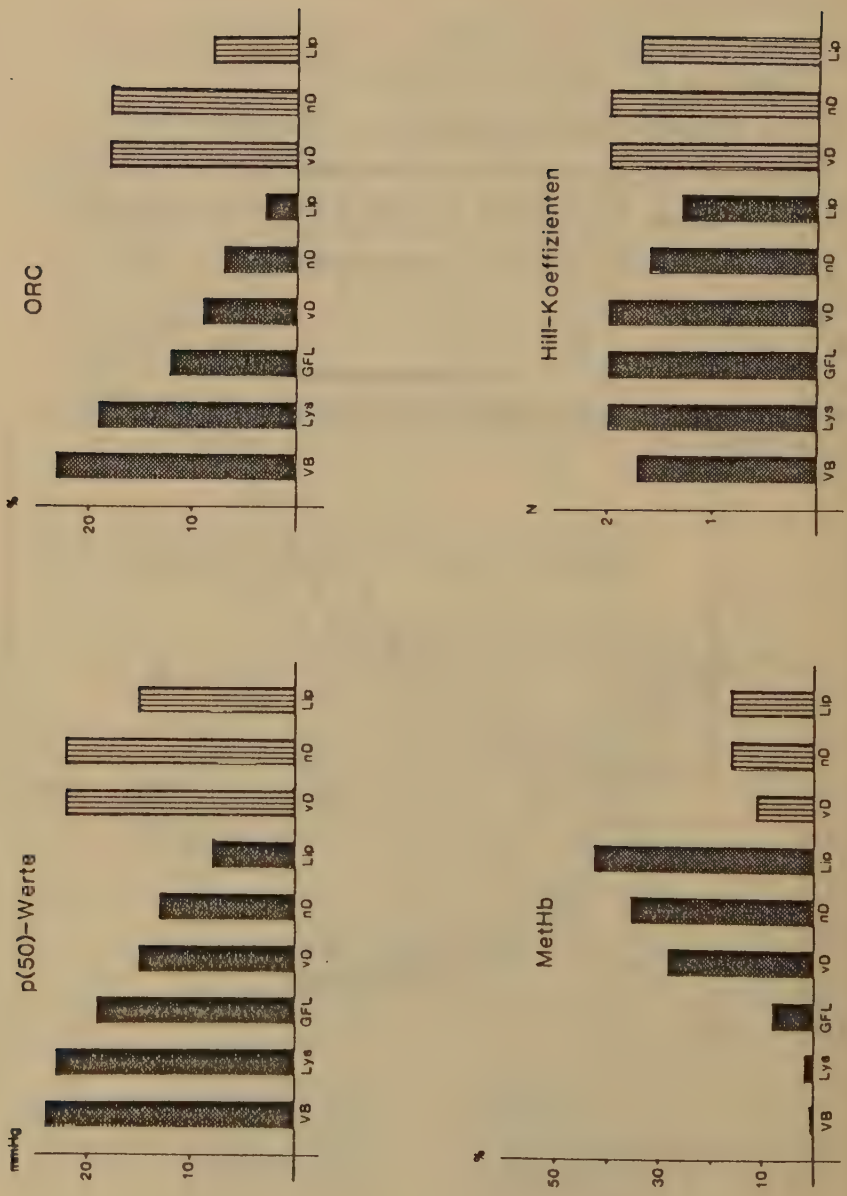


Abb.34 Beeinflussung der ODC und der MetHb-Bildung durch Tocopherol- und 2,3-DPG-Einbau in Hb-Liposomen (helle Balken)

5.2.7. Lagerstabilität

Die säulenchromatographischen Untersuchungen zur Stabilität der Hb-Liposomen während einer 5 wöchigen Lagerungszeit bei RT, 4° C und -20° C ergaben folgendes Bild (s.Abb.35).
Tiefgefrorene Hb-Liposomen setzten demnach schon ab dem 3.Tag teilweise ihr Hb frei, nach 20 Tagen ließen sich kaum noch intakte Vesikel nachweisen. Lecithin war als unlöslicher Niederschlag ausgefallen, Hb fand sich fast vollständig im Überstand.
Die bei 4° C gelagerten Hb-Liposomen zeigten ein ähnliches Resultat. Lecithin bildete hier kleine Micellen aus, die sich säulenchromatographisch auftrennen ließen.
Nach 35 Tagen waren lediglich die bei RT gehaltenen Hb-Liposomen noch stabil. Neben geringen Mengen an freiem Hb bildeten sich auch hier aus freigesetztem Lecithin kleine Micellen aus. Ausgefallenes Lecithin wurde bei dieser Probe nicht beobachtet.

5.2.8. Wechselwirkungen mit Heparin

Nach der Inkubation mit verschiedenen Heparinkonzentrationen zeigten die Hb-Liposomen keine veränderten S-Werte. Das Lec/Hb-Verhältnis blieb konstant, nach der Ultrazentrifugation wurde keine Aktivität im Überstand nachgewiesen.
Zur Verhinderung einer Blutgerinnung konnte für die entsprechenden in vitro und in vivo Versuche Heparin als Antikoagulans verabreicht werden.

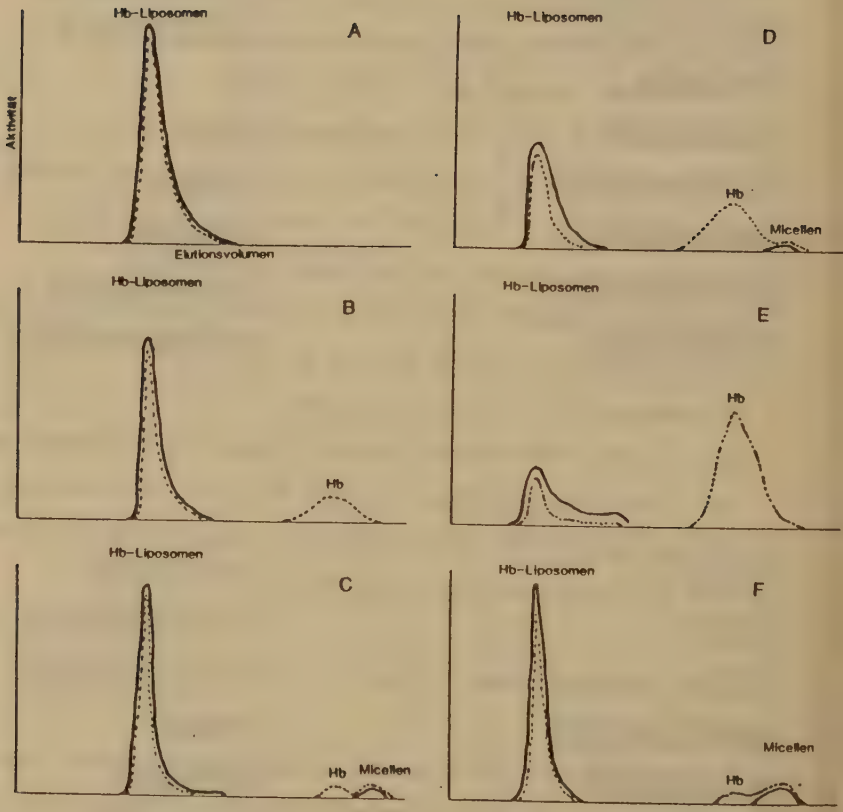


Abb.35 säulenchromatographische Auftrennung ^{14}C-Hb- und ^{3}H-Lec-markierter Hb-Liposomen
A= 3.Tag RT, 4°C B= 3.Tag -20°C C= 20.Tag RT
D= 20.Tag 4°C E= 20.Tag -20°C F= 35.Tag RT

5.3. in vitro Versuche

5.3.1. Ultrazentrifugen-Methode

Sowohl bei Inkubationen mit Rattenvollblut als auch mit Humanvollblut blieben die Hb-liposomen stabil. Bei Lec-Liposomen befand sich im Gegensatz dazu der überwiegende Teil an Aktivität im Überstand (s.Abb.36).

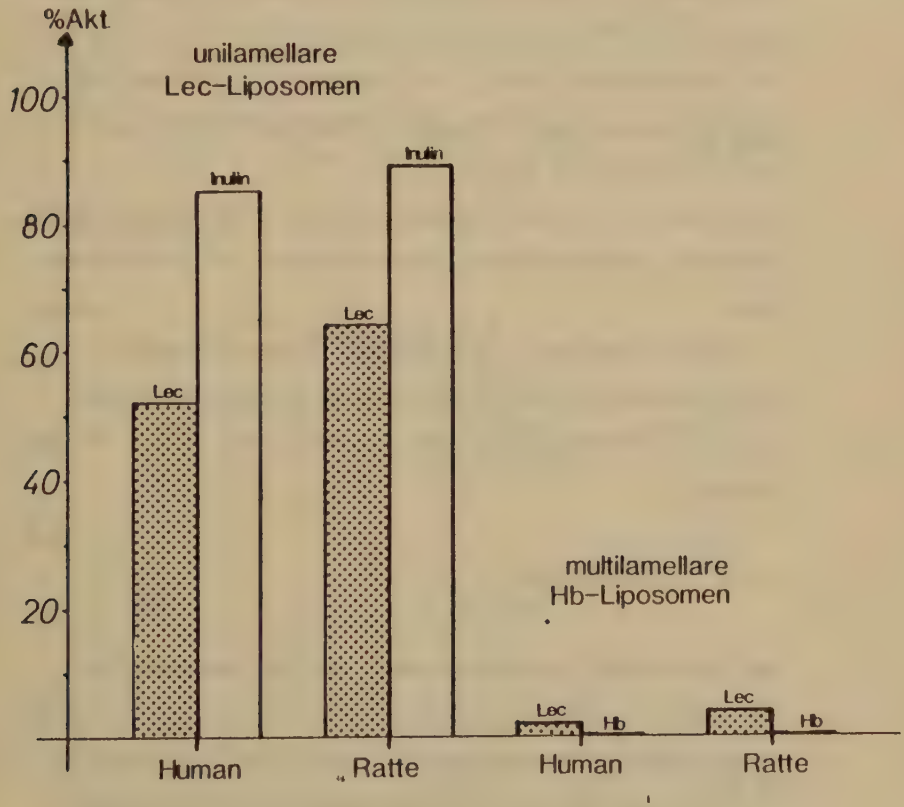


Abb.36 Inkubation von Liposomen mit Vollblut
Messung des radioaktiven Überstandes nach
3stündiger Ultrazentrifugation

Die Verschiebung des Lec/Inulin Verhältnisses zugunsten von Inulin deutet auf starke Permeabilitätsänderungen der Lecithinmembran während der Inkubation hin. Inulin kann die Membran passieren, ohne daß die Vesikel zerstört werden.

Sehr deutlich zeigte sich dieser Effekt bei Inkubationen mit Human-Cohn-IV-1- und Human-Cohn-IV-4-Fraktionen (s.Abb.37 u. 38).

Inkubationen mit Human- und Rattenserum und den Cohn-V-Fraktionen lieferten ähnliche Effekte wie mit Vollblut : multilamellare Hb-Liposomen blieben stabil, d.h. es konnte keine Aktivität im Überstand nachgewiesen werden, unilamellare Lecithin-Liposomen wurden zerstört (s.Abb.39 u. 40).

Auffallend ist, daß reines Albumin im Vergleich zur Cohn-V-Fraktion kaum einen negativen Einfluß auf die Stabilität von Lec-Liposomen hatte.

Alle anderen Proteine (s.Tab. 1) konnten in den eingesetzten Konzentrationen keine Aktivitätsanhäufung im Überstand bewirken.

Sowohl Lec-Liposomen als auch Hb-Liposomen blieben in ihren Strukturen erhalten.

5.3.2. Leberperfusionen

Bei der Aufnahme von Liposomen zeigte die Leber unabhängig vom Perfusionsmedium einen deutlichen Sättigungsbereich, der im in vitro Modell sowohl für Lec-Liposomen als auch für Hb-Liposomen bei ca. 0,6 mg Lecithin-Aufnahme lag. Als Liposomenmedium wurde HBSS-Lösung (Hb-Lipos), Phosphatpuffer I (Hb-Lipos, Lec-Lipos) und Human-Vollblut

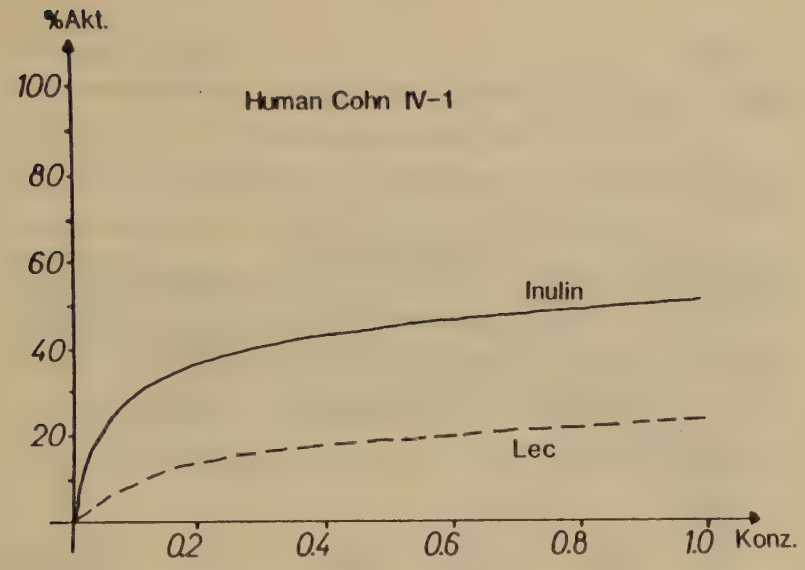


Abb.37 siehe Text

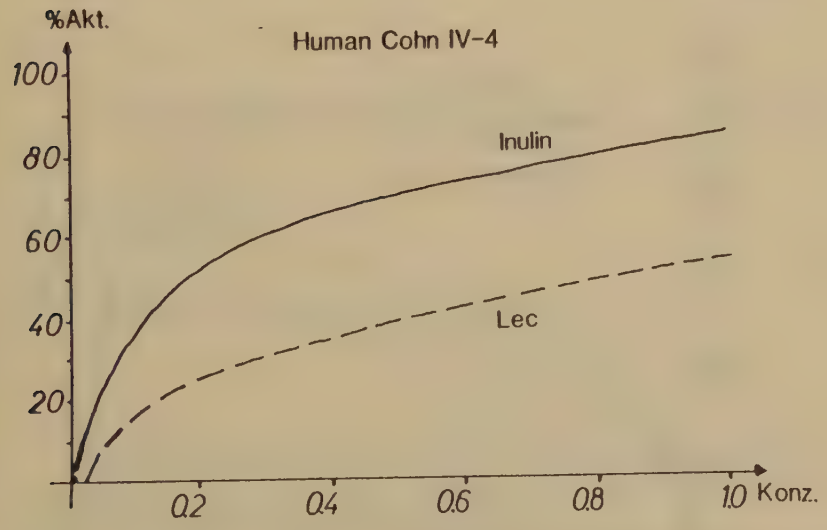


Abb.38 siehe Text

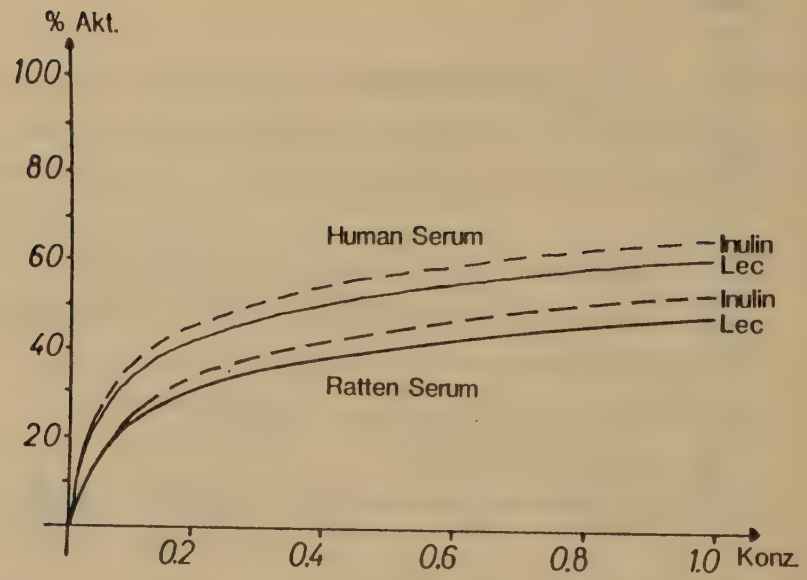


Abb.39 siehe Text

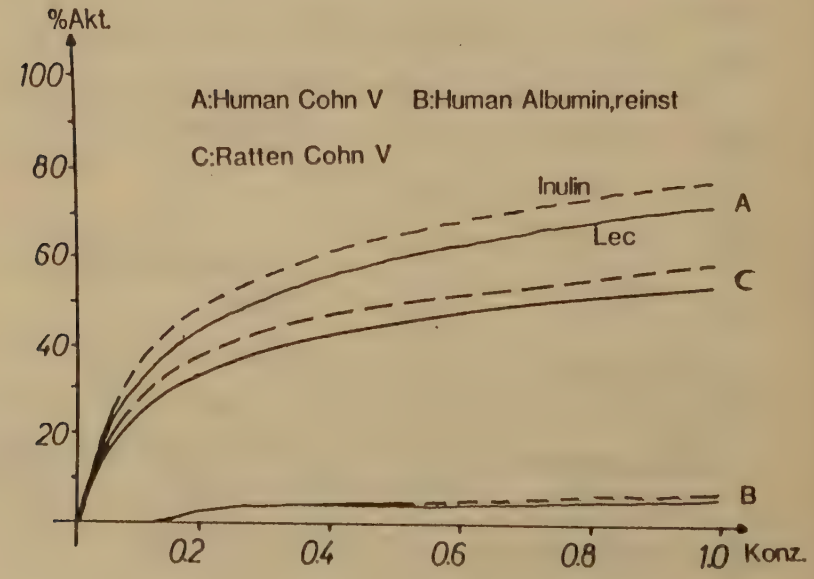


Abb.40 siehe Text

(Hb-Lipos) verwendet.

Eine fünffach höhere Aufnahme von Hb-Liposomen in die Leber (3,2 mg Lec) fand sich nach Versuchen am lebenden Tier (s.Abb.41).

Es konnte allerdings für das in vitro Modell nicht geklärt werden, wieviel Prozent der ektomierten Leber noch funktionsfähig war.

Transaminase-Nachweise (GOT, GPT) im Perfusionsmedium verliefen zwar negativ (keine nekrotisierten Zellen), ein eindeutiger Test für das Ausmaß der Vitalität von Leberzellen stand jedoch nicht zur Verfügung.

Nicht aufgenommene Liposomen blieben nach den Leberpassagen völlig intakt, was mit Hilfe der UZ-Methode (s.4.9.1.) nachgewiesen werden konnte.

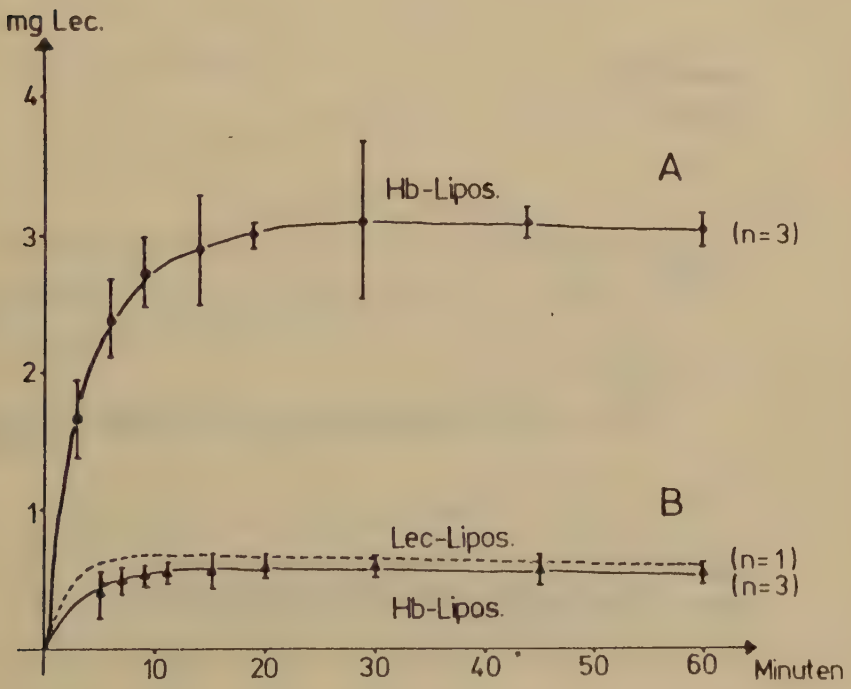


Abb.41 Aufnahme von Liposomen in die Leber in Abhängigkeit von der Perfusionszeit A: in vivo B: in vitro

5.3.3. Biolumat-Tests

Hb-Liposomen bewirkten im Phagocytosetest im Vergleich zu Lec-Liposomen eine Granulocyten-Aktivierung.
Da ein Biolumineszenz-Anstieg nur in Gegenwart von Serum im Testansatz zu beobachten war, muß auf eine Wechselwirkung der Hb-Liposomen mit opsonisierenden oder chemotaktischen Plasmafaktoren geschlossen werden. Sensibilisiertes Plasma (mit Hb-Lipos inkubiert, dann Hb-Lipos wieder abzentrifugiert) stimulierten die Granulocyten ebenfalls zur Phagocytose (s.Abb.42).

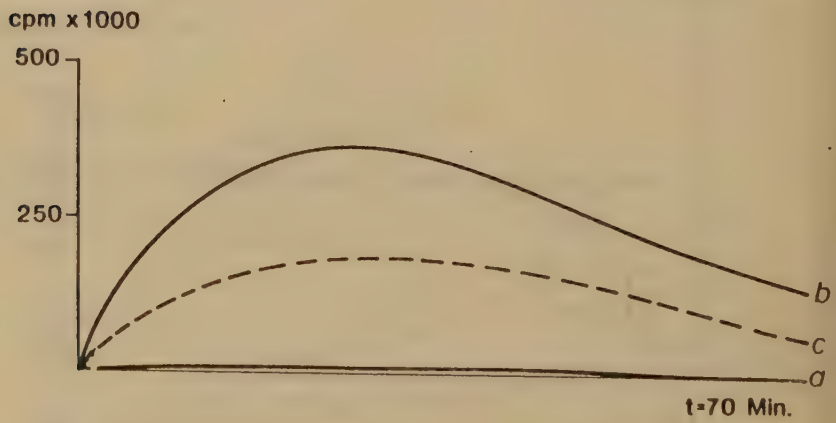


Abb.42 Phagocytose-Test: Granulocyten-Aktivierung
a: Lec-Lipos + Serum bzw. Hb-Lipos ohne Serum
b: Hb-Lipos + Serum c: sensibilisiertes Serum

Da der Testansatz immer auf eine bestimmte Zellzahl eingestellt wurde und nicht auf eine bestimmte Phagocytoseaktivität der Granulocyten (z.B. auf Zymosan), wurden die gemessenen Effekte nur qualitativ bewertet.
Quantitative Vergleiche mehrerer Tests waren deshalb nicht möglich, da die Biolumineszenz-Ausbeute bei gleichem Testansatz mit verschiedenen Granulocyten-Chargen zu sehr schwankten.
Bei isolierten Alveolarmakrophagen der Ratte konnte keine Phagocytoseaktivität mit Hb-Liposomen im Testansatz nachgewiesen werden.

5.4. in vivo Versuche

5.4.1. Immunologische Tests

Die Immunisierung von Ratten ergab keine positiven Reaktionen auf Antikörper. Präzipitationsringe nach der Methode von OUDIN (1952) konnten nicht nachgewiesen werden.

5.4.2. Plasmaelimination und Organaufnahme

In vivo Testungen mit radioaktiv markierten Hb-Liposomen zeigten einen zweiphasigen Verlauf während der Plasmaelimination (s.Abb.43a,b).
Die erste schnelle Phase markiert die rapide Aufnahme der Hb-Liposomen in die Leber (s.Abb.44). Die zweite langsame Phase kennzeichnet die

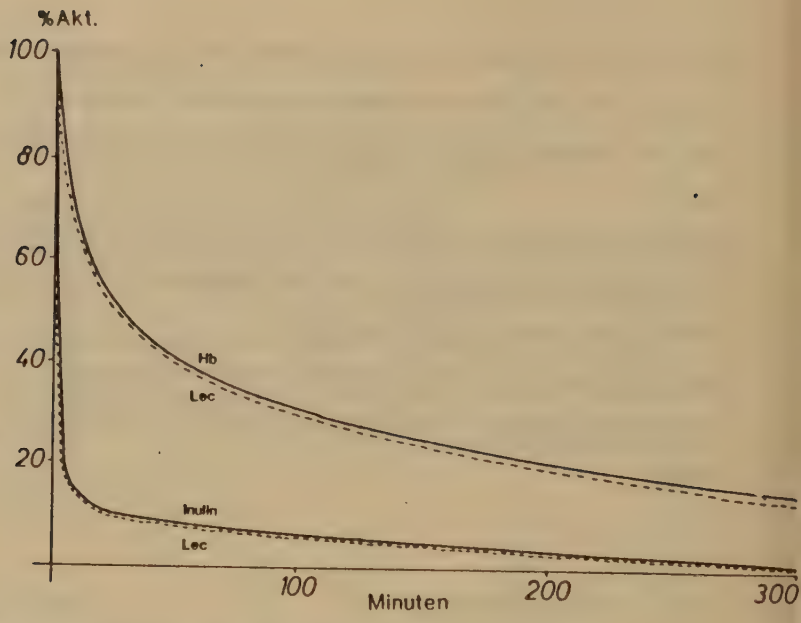


Abb.43a Elimination von Hb-Liposomen aus Rattenplasma im Vergleich zu Lec-Liposomen (n=20)

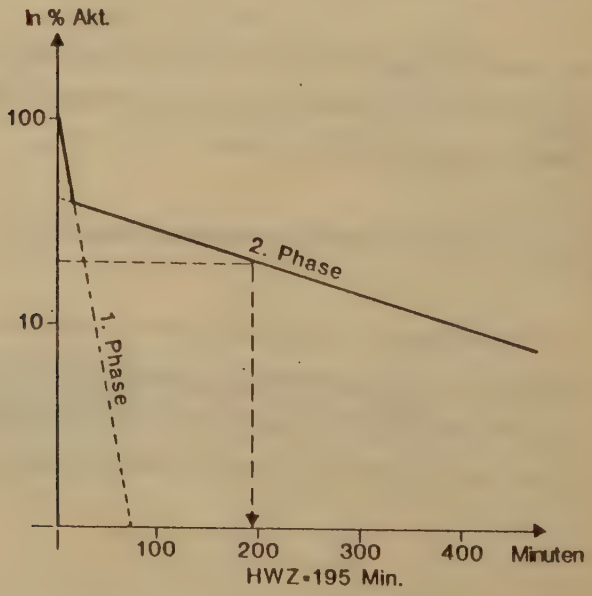


Abb.43b Elimination von Hb-Liposomen aus Rattenplasma

metabolische Abbaurate der Hb-Liposomen aus dem Intravasalraum mit einer Halbwertszeit von ca. 3 Stunden.

Lecithin-Liposomen wurden dagegen sehr viel schneller aus dem Organismus eliminiert (s.Abb.43a). Starke Wechselwirkungen mit Plasma bzw. Plasmaproteinen (s.5.3.1.) spielen hier sicherlich eine entscheidende Rolle.

Der parallele Verlauf der Eliminationskurve von ^{3}H-Lec und ^{14}C-Hb bzw. ^{14}C-Lec und ^{3}H-Inulin deuten auf intakte Liposomen während der gesamten intravasalen Verweildauer hin. Mit den Resultaten aus 5.2.1. muß dies zumindestens für die Lec-Liposomen bezweifelt werden. Hier liegt eher eine gleiche Metabolisierungsrate sowohl für Lecithin als auch für Inulin vor.

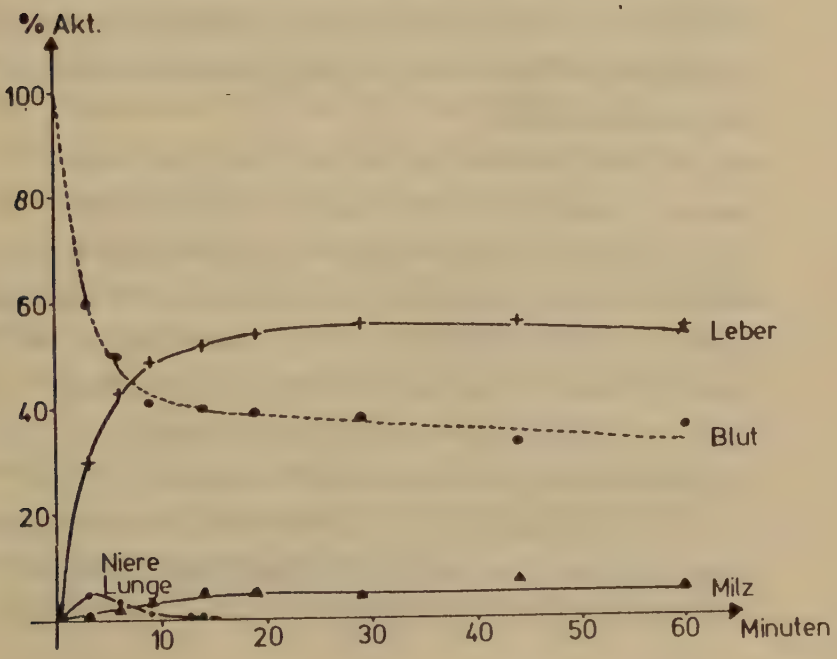


Abb.44 Plasmaelimination und Organaufnahme von Hb-Liposomen in vivo

6. DISKUSSION

Die dringende Notwendigkeit, von Blutkonserven möglichst unabhängig zu werden, drückt sich nicht zuletzt in der Vielzahl der Forschungsgruppen aus, die auf dem Gebiet eines Sauerstoff übertragenden Blutersatzstoffes arbeiten.

Besonderes Gewicht erhalten dabei die Präparate auf der Basis von stromafreien Hämoglobin-Lösungen (SFH), in denen Sauerstoff als natürlicher Ligand chemisch gebunden werden kann.

1967 erkannte RABINER das Erythrocytenstroma als Ursache für die Nephrotoxizität von Hb-Lösungen. Er führte für seine gereinigten Hb-Lösungen ("stripped Hb") den Begriff "Stromafreie Hb-Lösungen (SFH)" ein und schloß aus seinen Experimenten mit Hunden, daß SFH als Plasmaexpander mit Sauerstoff übertragenden Eigenschaften klinische Verwendung finden könnte.

Nach zehn Jahren intensiver Forschung mit SFH als potentiellem Sauerstoff transportierendem Volumenersatz faßte MESSMER (1978) die bis dahin gesammelten Daten in seiner Arbeit zusammen und hob zwei Nachteile von SFH-Lösungen besonders hervor. Einmal ist es die geringe Halbwertszeit (4-5 Std. bei Hunden, 2 Std. bei Affen, 45 Min. bei Ratten) zum anderen der Anstieg der SFH-Affinität zu Sauerstoff (P50-Werte zwischen 12 und 16 mmHg), die eine Verwendung von SFH-Lösungen als möglichen Blutersatzstoff verhindern.

Die rasche Elimination von Hb aus dem Plasma erfolgt über Haptoglobin, einem α_2-Mukoprotein, das einen stabilen Komplex speziell mit Hb bildet (SASAZUKI 1970). Dieser Komplex wird vom RES absorbiert und

metabolisiert. Freies, überschüssiges Hb im Plasma zerfällt in seine Untereinheiten (Dimere, Monomere) und wird durch die Glomeruli in den Urin ausgeschieden (SAVITSKY 1978). Die krasse Erhöhung der O_2-Affinität von SFH-Lösungen ist durch den Verlust von 2,3-DPG und anderer organischer Phosphate aus dem Erythrocytenmilieu zu erklären (BENESCH 1972, GOULD 1980).

Hinzu kommt, daß Hb onkoosmotisch aktiv ist. Der onkotische Druck von Plasma mit 25-28 mmHg wird schon von einer 6-7%igen Hb-Lösung (g/dl) erreicht, was bedeutet, daß die O_2-Kapazität einer solchen Lösung weniger als die Hälfte des Vollblutes mit normaler Erythrocyenkonzentration beträgt (BIRO 1983).

Alle Versuche, sowohl die intravasale Halbwertszeit zu erhöhen, als auch die Sauerstoffaffinität der SFH-Lösungen zu physiologischen Werten hin zu verbessern, basieren auf Modifikationen des Hb-Moleküls. Dextran-Hb-Komplexe verschiedener Molekülgrößen (CHANG 1977, TAM 1978), Quervernetzung von Hb mit Carbodiimid (LABRUDE 1979), polyvinylgebundene Hämoglobine (SCHMIDT 1979), Hb-Konjugate mit Polyäthylenglykol (AJISAKA 1980), Hb-Inulin-Konjugate mit Pyridoxalphosphat (IWASAKI 1983) und polymerisiertes SFH mit Pyridoxalphosphat (DE VENUTO 1982, KEIPERT 1982, SEHGAL 1984) sind die wichtigsten Hb-Derivate, mit denen experimentiert wird.

Die intravasale Haltbarkeit konnte drastisch verlängert werden (HWZ 25-38 Std.), allerdings meist auf Kosten einer sehr hohen Sauerstoffaffinität dieser Modifikationen. Die Hb-Lösungen können deshalb oft nur als Plasmaexpander ohne Sauerstoff übertragende Funktion betrachtet werden (BALDWIN 1982).

Vielversprechend ist die Entwicklung polymergebundener Hämoglobine.

Die Reduktion der Partikelzahl erlaubt ein konzentrierteres Angebot an Hb ohne Erhöhung des onkoosmotischen Druckes. Mit Pyridoxalphosphat zeigen diese poly-SFH-P-Lösungen physiologische O_2-Affinitäten und besitzen damit eine hohe O_2-Freisetzungskapazität.

"Polymerisiertes, pyridoxyliertes Hämoglobin ist gegenwärtig die einzige Hb-Modifikation, die die O_2-Transportkapazität von Vollblut erreicht und infundiert werden kann, ohne den kolloidosmotischen Druck des Plasmas zu verändern" (SEHGAL 1984).

Die Experimente sind allerdings noch in der Versuchsphase.

Andere Techniken, wie z.B. der Einschluß von Hb in Polyhämoglobinmembranen (DAVIS 1982) zur Herstellung künstlicher Erythrocyten, oder die Einschleusung von liposomal verpacktem Inositolhexaphosphat in Erythrocyten durch Liposom-Zell-Fusionen, um den Verlust an 2,3-DPG in den roten Blutzellen auszugleichen und damit die Lagerzeit von Blutkonserven zu verlängern (GERSONDE 1978), waren ohne Erfolg und wurden wieder aufgegeben.

Um den Sauerstoff von der Lunge in die Gewebe und den Rücktransport von Kohlendioxid aus der Peripherie in die Lunge zu bewältigen, wechselt das Hb-Molekül zwischen zwei Strukturen hin und her, die mit T (=tense, gespannt) und R (=relaxed, entspannt) bezeichnet werden. Der Übergang von der T- in die R-Struktur wird durch die Drehung eines Untereinheitenpaares (α_1-β_1) relativ zum anderen (α_2-β_2) bewirkt. Die O_2-Affinität der R-Struktur ist um einige Hundertmal größer als die der T-Struktur (PERUTZ 1979).

Die Umschaltung geschieht je nach Sauerstoffangebot und wird stark von Stoffen wie 2,3-DPG, Cl^--Ionen, H^+-Ionen und CO_2 (Kooperative Effekte) beeinflußt.

Polymerisierte und pyridoxylierte Hb-Moleküluntereinheiten werden in ihrer Bewegungsfreiheit zwangsläufig eingeschränkt, zumal eine kontrolliert ablaufende Vernetzungsreaktion nicht möglich ist. Die Funktion des Hb-Moleküls wird beeinträchtigt, was sich besonders durch die Linksverschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve und durch den Verlust des sigmoiden Kurvenverlaufs bemerkbar macht. Erfolgsmeldungen über gelungene Tierexperimente mit poly-SFH-P sind deshalb eher skeptisch zu beurteilen, zumal Angaben über die Ausbeute an polymerem Hb, den Grad der Vernetzung, über die Entfernung überschüssiger cytotoxischer Dialdehyde, über den Verlust an Hb durch Denaturierung und die Oxydation zu MetHb in den entsprechenden Literaturstellen meistens fehlen.
Für die Konzeption der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, daß die konventionelle Quervernetzung der Hb-Ketten vermieden werden muß, um ein funktionell optimales Produkt zu erhalten. Als ein Lösungsweg wurde die Kompartimentierung des Hämoglobins in Liposomen angesehen.

Aus der Vielzahl an Präparationsmethoden wurden vier ausgewählt, die in den verschiedensten Arbeitsgruppen am häufigsten Anwendung finden. Als Methode der Wahl muß für die Hb-Liposomenpräparation die Durchflußdialyse von MILSMANN (1978) angesehen werden. Mit keiner anderen Präparation konnten so hohe Einschlußraten von Hb erzielt werden. Die Methode liefert gut reproduzierbare Liposomenchargen, homogen in Größe und Struktur, und immer mit gleicher Ausbeute. Der Vergleich und die Beurteilung einzelner Experimente sowohl in vitro

als auch in vivo wird dadurch erheblich erleichtert. Es gibt keinen Verlust an eingesetzten Substanzen, da nicht eingeschlossenes Material säulenchromatographisch wiedergewonnen wird und weiterverwendet werden kann (Hb-Recycling).

Denaturierung und massive Oxydation bzw. Hemichrombildung des Hb, wie sie bei der Ultraschall- und Ätherinjektionsmethode beobachtet werden konnte und auch von SZEBENI (1984) bestätigt wird, traten während der Durchflußdialyse-Präparation nicht auf.

Hinweise auf n-Octyl-GP als geeigneten Emulgator kamen von HELENIUS (1975) und von BARON (1975), der in schonender Weise Proteine aus der Bakterienmembran von Streptococcus faecalis herauslösen konnte, ohne Enzymaktivitäten einzubüßen. Für PHILIPPOT (1983) scheint die Detergensdialyse die schonenste Methode zu sein, um Strukturen und Aktivitäten von Makromolekülen zu erhalten. Auch er wählte in seinen Experimenten n-Octyl-GP als Emulgator, weil dieser sich restlos wieder entfernen ließ.

Untersuchungen über die Phospholipidzusammensetzung der inneren Erythrocytenmembran ergaben eine Mischung aus 30% Phosphatidylcholin (PC), 25% Sphingomyelin (SM), 30% Phosphatidyläthanolamin (PE), 13% Phosphatidylserin (PS), 1% Kardiolipin und 1% Phosphatidylinositol (SHINITZKY 1976, ZWAAL 1978).

Da die Verwendung von SM in verschiedenen molaren Verhältnissen mit PC für die Hb-Liposomen-Präparation keine befriedigenden Ergebnisse in Bezug auf den Hb-Einbau lieferte und PS in ungünstiger Weise mit der Häm-Gruppe des Hb konkurriert (Globin-Häm + PS → Häm-PS + Globin, SHVIRO 1982), wurde auf diese Lipide verzichtet.

Um starke elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Hb und

Phospholipiden zu vermeiden (SZUNDI 1980), wurde Phosphatidylcholin als neutrales Lipid für die Hb-Liposomen-Präparation gewählt. Phosphatidyläthanolamin kam nicht zum Einsatz.

Obwohl die Idee, einen künstlichen Erythrocyten durch Mikroverkapselung von Hb zu erzeugen, schon 1957 von Chang vorgetragen wurde (CHANG 1980, HUNT 1983), blieben Veröffentlichungen in Bezug auf diese Forschungsrichtung sehr spärlich.
Die Möglichkeit, Hb in Liposomen einzuschließen, wurde zum erstenmal von DJORDJEVICH (1980) beschrieben. Er verwendete Phosphatidylcholin, Cholesterin, Phosphatidsäure und Dialkylphosphat in unterschiedlichen Mischungen als Liposomenmaterial. Seine sogenannten "Hämosomen" stellte er u.a. durch Variation der klassischen Ultraschall-Methode (s.4.8.1.1.) her. Dabei wurde die Phospholipid-Lösung unter Vakuum getrocknet und bis zu einer Menge von 10 g angereichert. Die trockene Phospholipidmischung wurde dann zu 100 ml einer 10-12g%igen Hb-Lösung gegeben, aufgeschüttelt (handshaken) und ultrabeschallt ("bulk method"). Je nach Lipidzusammensetzung und Versuchsanordnung erhielt er Hämosomen in einer Größe von 200Å bis zu 20-30 µm, die 12 bis 15g% Hämoglobin enthielten. Die Membran war meist multilamellar, tendierte aber nach Ultrabeschallung zu unilamellaren Strukturen hin. Hämosomen mit einem Lecithin/Cholesterin-Verhältnis von 3:1 und einem Einschluß von 10g% SFH in 0.9%iger Saline zeigten in ihren Sauerstoffdissoziationskurven eine wenig ausgeprägte Sigmoidität, aber einen dem Vollblut vergleichbaren P50-Wert von 28 mmHg. Diese Hämosomen waren bei -20° C sechs Wochen stabil.

Über das Ausmaß der Autoxidation bzw. den Anteil von MetHb in den Hämosomen wurden leider keine Angaben gemacht.

Eigene Experimente nach der dort beschriebenen Herstellungsmethode für sogenannte Hämosomen ergaben immer multilamellare Liposomen mit einem geringen Hb-Einschluß von knapp 4% der eingesetzten Menge. Die Dissoziationskurven zeigten eine Linksverschiebung zu hohen O_2-Affinitäten (P50-Wert=7mmHg) und der Kurvenverlauf ließ keine sigmoide Form erkennen, was den Verlust kooperativer Effekte anzeigt.

Ein Vergleich von Hämosomen mit Hb-Liposomen in Bezug auf die Lagerstabilität bei -20° C (s.5.2.7.) lieferte auch hier andere Ergebnisse. Allerdings könnte der Einschluß von Cholesterin in die Hämosomenmembran eine andere Packungsdichte der Lipide verursachen und so die Stabilität erhöhen (PRESTI 1982).

HUNT (1983) gelang ebenfalls die Herstellung von liposomal verpacktem Hb. Seine sogenannten "Neohämocyten" präparierte er nach einer von SZOKA (1978) entwickelten Methode zur Herstellung unilamellarer Phospholipidvesikel, der "reversed-phase"-Methode.

Die Ölphase besteht aus einer Mischung leicht flüchtiger Lösungsmittel (keine genauen Angaben), die einerseits Hb nicht denaturieren und andererseits die späteren Membranbestandteile Phosphatidylcholin, α-Tocopherol, Phosphatidsäure und Cholesterin lösen sollte. Die wässrige Phase ist in der Ölphase emulgiert und wird von den hydrophilen Seiten der Membranbestandteile eingegrenzt. Sie enthält gereinigtes Hb in einer Konzentration von 17-20g% und 2,3-DPG in einem molaren Verhältnis zu Hb von 1:5.

Die Öl/Wasser/Öl-Emulsion kehrt sich durch vorsichtiges Abziehen der leicht flüchtigen Lösungsmittel in eine Wasser/Öl/Wasser-Emulsion um.

Nach Entfernen des restlichen Lösungsmittels und des nicht eingeschlossenen Hb (nicht näher beschrieben) sind Neohämocyten mit einem Durchmesser von 4000Å entstanden, die zum größten Teil multilamellare Strukturen besitzen. Die Sigmoidität der Sauerstoffdissoziationskurve ist ausgeprägt, der P50-Wert beträgt 26 mmHg, der Hill-Koeffizient 2.1 und der MetHb-Gehalt 4% im Vergleich zum Gesamt-Hb-Gehalt. Die eingeschlossenen Hb-Konzentrationen liegen bei einem Wert von 15.8g%.

Die Art der Herstellung sowie die angegebene Größe der Neohämocyten läßt vermuten, daß das Hb/Lipid-Verhältnis im Gegensatz zu Hb-Liposomen stark zugunsten von Hämoglobin verschoben ist. Zusammen mit dem relativ niedrigen MetHb-Gehalt sollten Neohämocyten eine dem Blut angenäherte O_2-Transportkapazität aufweisen.

Bezüglich des Hb-Einschlusses bzw. des Lipideinbaus in die Neohämocyten im Vergleich zum Gesamtansatz fehlen leider genaue Angaben, ebenso, wie für die restlose Beseitigung der sicherlich toxischen organischen Phase, so daß die Effizienz dieser Methode zur Zeit noch nicht beurteilt werden kann. Es bleibt zudem abzuwarten, welche Lagerstabilität die Neohämocyten aufweisen, wie stabil sie gegenüber Plasmaproteinen sind und welche biologische Halbwertszeit sie besitzen. Die Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

Berücksichtigt man für die Hb-Liposomen, daß 16% der Hb-Menge in den Liposomen als MetHb vorliegt, d.h. für den O_2-Transport ausfällt, so können von 60mg Hb pro Ansatz noch 50mg pro Ansatz (6ml) zur O_2-Übertragung in Betracht gezogen werden (s.5.2.3.Tab.3).

1 g Hb kann 1.34 ml Sauerstoff binden (Hüfner-Zahl). Die Sauerstofftransportkapazität des Blutes berechnet sich nach

Herz-Zeit-Volumen mal arterieller Sauerstoffsättigung mal Hb-Konzentration mal Hüfner-Zahl und liegt bei einer Ausschöpfung des Hb von 23% (arteriell-venöse Druckdifferenz s.5.2.3.Tab.3) bei etwa 1000 ml/min. Ein gesunder Erwachsener mit einem Blutvolumen von etwa 5.4 l benötigt für diese Transportkapazität ca. 810 g Hb (15g%). Diese Menge Hb könnte bei der vorliegenden Hb-Liposomen-Lösung dadurch erreicht werden, daß der Ansatz um das 18fache aufkonzentriert wird. Durch Pelletierung und Resuspendierung (s.5.2.4.) läßt sich dies leicht bewerkstelligen. Allerdings kann bei der vorliegenden Sauerstoff-Freisetzungskapazität (ORC) von 8% für Hb-Liposomen (s.5.2.3.Tab.3) nur mit einem Viertel der O_2-Versorgung des Vollblutes gerechnet werden, was aber theoretisch wenigstens teilweise durch ein höheres Herz-Zeit-Volumen ausgeglichen werden könnte.
Die Lagerstabilität (s.5.2.7.Abb.35F) erstreckt sich über einen den Blutkonserven vergleichbaren Zeitraum von 35 Tagen, wobei von Vorteil ist, daß Hb-Liposomen ungekühlt bei RT gelagert werden können.
Immunologisch scheinen Hb-Liposomen keine Reaktionen auszulösen, ein Antikörpertiter im Rattenserum konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse gelten allerdings nur in Bezug auf die Ratte als Versuchstier und können nur unter Vorbehalt so interpretiert werden, da für das verwendete Testsystem kein positives Kontrollserum zur Verfügung stand, das die Richtigkeit des Testansatzes bestätigte.
Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen konnte BANERJI (1982) zumindestens in Mäusen ein monoklonales IgM, einen sogenannten "anti-Liposom"-Antikörper züchten, der gegen Lipososmen gerichtet ist, die Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin in der Membran enthalten.

Die Aktivierung von neutrophilen Granulocyten aus Humanblut nicht nur durch Hb-Liposomen, sondern auch durch sensibilisiertes Serum alleine (s.5.3.3.Abb.42) läßt eine Beteiligung des Komplementsystems in einer unspezifischen Immunantwort vermuten.
Insbesondere C5a, ein Spaltprodukt der 5. Komplementkomponente könnte hier eine Rolle spielen, da es eine starke chemotaktische Substanz für polymorphkernige neutrophile Granulocyten und mononukleäre Phagocyten darstellt.
Diese Vermutung wird unterstützt durch eine Arbeit von ESSER (1979), worin er feststellt, daß besonders die Komplementkomponenten C5b-8 und C5b-9 als "membrane attack complex" (MAC) eine feste Bindung mit planaren Lipidbilayern eingehen und die Membranstruktur beeinflussen.
Die negativ ausgefallenen Biolumineszenzversuche mit Alveolarmakrophagen der Ratte lassen sich damit allerdings nicht in Einklang bringen. Möglicherweise liegt hier ein Fehler im Testsystem vor, das von BRUCHELT (1984) in dieser Form auf Granulocyten als Testzellen optimiert wurde.

Die intravasale Eliminationsrate von Liposomen unterliegt verschiedenen, noch weitgehend unbekannten Mechanismen. Die starke Wechselwirkung mit "High-Density"-Lipoproteinen (HDL in Cohn-IV-1 und Cohn-IV-4 s.5.3.1., CHOBANIAN 1979) und die rasche Aufnahme in die Leber und in die Milz (s.5.4.2.) verhindern eine längere Zirkulation im Kreislauf.
Interessanterweise besitzen Hb-Liposomen im Vergleich zu unilamellaren Lecithin-Liposomen eine hohe Resistenz gegenüber Vollblut.
Multilamellare Strukturen und der Einbau von Hb in die

Liposomenmembran scheinen diese Stabilität zu verursachen. Die Aufnahme von Liposomen in die Leber bleibt im Gegensatz dazu von Struktur und Proteingehalt in der Liposomenmembran unbeeinflußt. Hier scheint ein eigener, von Plasmaproteinen unabhängiger Aufnahmemechanismus vorzuliegen. Unspezifische Adhäsion, Fusion und Endocytose werden als Liposom-Zell-Wechselwirkungen diskutiert (PAGANO 1978, HOEKSTRA 1978, ABRA 1982, ROERDINK 1984). Die Kupfferschen Sternzellen der Leber und das Retikuloendotheliale System spielen bei der Elimination von Liposomen auf jeden Fall eine entscheidende Rolle (ROERDINK 1981, KAO 1981).

Berücksichtigt man den Sättigungseffekt der Leber bei der Aufnahme von Liposomen (s.5.3.2.), so kann bei höher dosierter Applikation der Hb-Liposomen mit einer merklichen Verlängerung der Halbwertszeit gerechnet werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Herstellung von Hb-Liposomen mit Hilfe der Durchflußdialyse konnte eine neue Methode entwickelt werden, um Hämoglobin in Phospholipidvesikel einzuschließen. Als Membrankomponenten wurden Phosphatidylcholin (Lecithin) und α-Tocopherol im Verhältnis 40:1 verwendet. Hämoglobin konnte aus Erythrocyten isoliert und mit einem Anteil von 6% MetHb in die Präparation eingesetzt werden. Sein mittlerer P50-Wert betrug 18,6 mmHg, der Hill-Koeffizient 2,02 und die mittlere Sauerstoff-Freisetzungskapazität 12,4%.

Als Emulgator wurde n-Octyl-GP ausgewählt.

Die Hb-Liposomen haben einen Durchmesser von 2000Å und sind in ihrer Struktur multilamellar. Das Lipid/Hämoglobin-Verhältnis beträgt 139:1. Rund 85% des in den Liposomen vorhandene Hb ist in die Lipidschicht der Bilayer integriert.

Hb-Liposomen besitzen einen mittleren P50-Wert von 15 mmHg, einen Hill-Koeffizienten von 1.7, eine Sauerstoff-Freisetzungskapazität von 8% und einen MetHb-Gehalt von 16%.

Sie zeigen gegenüber Vollblut und verschiedenen Plasmaproteinen eine hohe Resistenz und können mindestens 5 Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Abra R.M., Hunt C.A.
Res.Com.Chem.Pathol.Pharmac. Vol.36 (1982) No.1, 17-31

Amberson W.R., Flexner J., Steggerda F.R., Mulder A.G., Tendler M.J., Pakratz D.S., Lang E.P.
J.Cell Comp.Physiol. 5 (1934), 359

Baldwin J.E., Gill B.
Medical Laboratory Sciences 39 (1982), 45-51

Baldwin J.E.
Advances in Blood Substitute Research, 149-155
Alan R.Liss, Inc., New York,N.Y. (1983)

Banerji B., Lyon J.A, Alving C.R.
BBA 689 (1982), 319-326

Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C.
J.Mol.Biol. 13 (1965), 238-252

Barenholzt Y., Amselem S., Lichtenberg D.
FEBS Letters Vol.99 (1979) No.1, 210-214

Baron C., Thompson T.E.
BBA 382 (1975), 276-285

Bartlett G.R.
J. Biol. Chem. 234 (1959), 466-468

Batzri S., Korn E.D.
BBA 298 (1973), 1015-1019

Bayer E., Holzbach G.
Angew.Chem. 89 (1977), 120-128

Benesch E., Benesch R., Renthal R.D., Maeda N.
Biochemistry Vol.11 (1972) No.19, 3576-3582

Benesch R.E., Benesch R., Yung S.
Anal. Biochem. 55 (1973), 245-248

Biro G.P.
Can.Med.Assoc.J. Vol.129 (1983), 237-244

Bruchelt G., K.H.Schmidt
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22 (1984), 1-13

Brunner J., Skrabal P., Hauser H.
BBA 455 (1976), 322-331

Chang T.M.S.
Trans.Am.Soc.Artif.Intern.Organs Vol.XXVI (1980), 354-357

Chobanian J.V., Tall A.R., Brecher P.I.
Biochemistry Vol.18 (1979) No.1, 180-187

Cornell B.A., Middlehurst J., Separovic F.
BBA 598 (1980), 405-410

Cuppoletti J., Mayhew E., Zobel C.R., Jung C.Y.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol.78 (1981) No.5, 2786-2790
(Biochemistry)

Davis T.A., Asher W.J., Wallace H.W.
Trans.Am.Soc.Artif.Intern Organs Vol.XXVIII (1982), 404-407

Deamer D., Bangham A.D.
BBA 443 (1976), 629-634

Djordjevich L., Miller I.F.
Exp.Hemat. Vol.8 (1980) No.5, 584-592

Dodje J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.
Arch. Biochem. Biophys. 100 (1963), 119-130

Doczi J., Morristown N.J.
United States Patent 3.991.181 Nov.9, 1976

Esser A.F., Kolb W.P., Podack E.R., Müller-Eberhard H.J.
Proc.NatlAcad.Sci.USA Vol.76 (1979) No.3, 1410-1414
(Immunology)

Enoch G.H., Strittmatter P.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 (1979), 145-149
(Biochemistry)

Eytan G., Matheson M.J., Racker E.
FEBS Letters Vol.57 (1975) No.2, 121-125

Frankfurter Allgemeine Zeitung (FAZ)
Ausgabe vom 11.1.84, 11

Gersonde K., Nicolau Y.
Europäische Patentschrift 0001104 B1 vom 4.9.1978

Gould S.A., Rosen A.L., Sehgal L., Sehgal H.,
Rice C.L., Moss G.S.
Trans.Am.Soc.Artif.Intern.Organs Vol.XXVI (1980), 350-353

Gregoriadis G.
The New England Journal Of Medicine Vol.295 (1976) No.13,
704-710 (a)
765-770 (b)

Gregoriadis G., Neerunjun D.E.
Eur. J. Biochem. 47 (1974), 179-18

Helenius A., Simons K.
BBA 415 (1975), 29-79

Hitzig W.H.
"Plasmaproteine" 2.Aufl.
Springer Verlag 1977

Hjort R., Jonsson A.K., Vretblad P.
J. Immunol. Meth. 43 (1981), 95-10

Hoekstra D., Tomasini R., Scherphof G.
BBA 542 (1978), 456-469

Huang C., Mason J.T.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.75 No.1 (1978), 308-310
(Biophysics)

Huang C.
Biochemistry 8 (1969), 344-352

Hunt C.A., Burnette R.R.
Advances in Blood Substitute Research (1983), 59-69

Hwang K.J., Luk K.S., Beaumier P.L.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol.77 (1980) No.7, 4030-4034

Iwasaki K., Ajisaka K., Iwashita Y.
Bioch.Biophys.Res.Comm. Vol.113 (1983), 513-518

Johnson S.M., Bangham A.D., Hill M.W., Korn E.D.
BBA 233 (1971), 820-826

v.Kampen E.J., Zijlstra W.G.
Clin.Chim. Acta 6 (1961), 538

Kao Y.J., Juliano R.L.
BBA 677 (1981), 453-461

Keipert P., Minkowitz J., Chang T.M.S.
Int.J.Artif.Organs 5 (1982), 383-385

Kim s., Martin G.M.
BBA 646 (1981), 1-9

Klein R.A.
BBA 210 (1970), 486-489
(Short Communication)

Kremer J.M.H., v.d.Esker M.W., Pathmamanoharan C., Viersema P.
Biochemistry 16 (1977) No.17, 3932-3935

Lichtenberg D. Freire D., Schmidt C.F., Barenholz Y.,
Felgner P.L., Thompson T.E.
Biochemistry 20 (1981), 3462-3467

Lundsgaard-Hansen P.
Deutsche Med. Wochenschr. 35 (1980), 1197-1198

Messmer K., Jesch F., Schaff J., Schönberg M., Pielsticker K.,
Bonhard K.
Blood Substitutes and Plasma Expanders, 175-190
Alan R.Liss, Inc., New York, N.Y. 1978

Milsmann H.W., Schwendener R.A., Weder H.G.
BBA 512 (1978), 147-155

Naito R., Yokoyama K.
The Green Cross Corporation
Technical Information Ser. No.5 (1978)

Oudin J.
Methods Med. Res. 5 (1952), 335

Oku N., Scheerer J.F., MacDonald R.C.
BBA 692 (1982), 384-388

Olson F., Hunt C.A., Szoka F.C., Vail W.J., Papahadjopoulos D.
BBA 557 (1979), 9-23

Pagano R.E., Weinstein J.N.
Ann.Rev.Biophys.Bioeng. 7 (1978), 435-468

Papahadjopoulos D., Vail W.J., Jacobson K., Poste G.
BBA 394 (1975), 483-491

Perutz M.F.
Ann.Rev.Biochem 48 (1979), 327-386

Peterson G.L.
Anal. Biochem. 100 (1979), 201-220

Philippot J., Mutaftschiev S., Liautard J.P.
BBA 734 (1983), 137-143

Pillwat G., Washausen P., Klein J., Zimmermann U.
Z.Naturforsch. 35c (1980), 352-356

Presti F.T., Chan S.I.
Biochemistry 21 (1982), 3821-3835

Pristoupil T.I., Kramlova M., Fricova V., Ulrich S.,
Kraml J., Jojkova K.
J.Chromatography 213 (1981), 183-187

Rabiner S.F., Helbert J.R., Lopas H., Friedman L.H.
J.Exp.Med. 126 (1967), 1127-1142

Richterich R. "Klinische Chemie"
Akad. Verlagsges. Frankfurt, 2.Aufl. 1968

Righetti P.G.
J. Chromatogr. 98 (1974), 271-321

Righetti P.G., Tudor G.
J. Chromatogr. 220 (1981), 115-194

Rhoden V., Goldin S.M.
Biochemistry Vol.18 (1979) No.19, 4173-4176

Roerdink F., Dijkstra J., Hartman G.,
Bolscher B., Scherphof G.
BBA 677 (1981), 79-89

Roerdink F., Regts J., v.Leeuwen B., Scherphof G.
BBA 770 (1984), 195-202

Sasazuki T.
Proc.Japan Acad. 46 (1976), 820-825

Savitsky J.P., Doczi J., Black J., Arnold J.D.
Clin.Pharmacol.Ther. Vol.23 (1978) No.1, 73-80

Schmidt K.
Klin.Wochenschr. 57 (1979), 1169-1175

Schubert R., Jaroni H., Schoelmerich J., Schmidt K.H.
Digestion 28 (1983), 181-190

Sehgal L.R., Rosen A.L., Noud G., Sehgal H.L., Gould S.A.,
DeWoskin R., Rice C., Moss G.S.
J.Surgical Research 30 (1981), 14-20

Sehgal L.R., Sehgal H.L., Rosen A.L., Gould S.A.,
Rice C.L., Moss G.S.
J.Surgical Research 31 (1981), 13-17

Sehgal L.R., Gould S.A., Rosen A.L.,
Sehgal H.L., Moss G.s.
Surgery 95 Vol.4 (1984), 433-438

Sessa G., Weissmann G.
J.Biol.Chem. 245 (1970), 3295-3301

Shinitzky M., Inbar M.
BBA 433 (1976), 133-149

Shviro Y., Zilber I., Shaklai N.
BBA 687 (1982), 63-70

Slack J.R., Anderton B.H., Day W.A.
BBA 32J (1973), 547-559

Straub F.Bruno "Biochemie"
Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften
Budapest 1960

Szebeni J., Breuer J.H., Szelenyi J.G., Bathori G.,
Lelkes G., Hollan S.R.
BBA 798 (1984), 60-67

Szoka jr. F., Papahadjopoulos D.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1978) Vol 75 No.9, 4194-4198
(Biochemistry)

Szundi I., Szelenyi J.G., Breuer J.H., Berczi A.
BBA 595 (1980), 41-46

Träuble H., Grell E.
Neurosciences Res.Prog.Bull. Vol.9 (1971) No.3, 373-380

Trush M.A., Wilson M.E., van Dyke K.
Methods in Enzymology 57 (1979), 462-494

Tsuchida E., Nishide H., Sekine M., Yamagishi A.
BBA 734 (1983), 274-278

Turner M.J., Sanderson A.R.
Biochem.J. 171 (1978), 505-508

Tyrrell D.A., Richardson V.J., Ryman B.E.
BBA 497 (1977), 469-480

De Venuto F., Zuck T.F., Zegna A.I., Moores W.Y.
J.Lab.Clin.Med. Vol.89 (1977) No.3, 509-516

De Venuto F., Zegna A.
Int.Symp.Blood Substitutes
Lettermann Army Inst.of Research
San Francisco 1982

Work T.S., Work E. (Editors)
"Laboratory Technics in Biochemistry and Molecular Biology"
North Holland Publishing 1976

Zumbuehl O., Weder H.G.
BBA 640 (1981), 252-262

Zwaal R.F.A.
BBA 515 (1978), 163-205

LEBENSLAUF

Herkunft:	Am 18. September 1950 Geburt in Schwäbisch-Gmünd als dritter Sohn des Journalisten Hans Jaroni und seiner Ehefrau Gertrud geborene Theis
Schulbesuch:	1957 Einschulung in die Volksschule St.Nikolaus im Bonner Ortsteil Kessenich. 1960 Besuch des Friederich-Ebert-Gymnasiums in Bonn. Umzug nach Köln. Wechsel in das Montessori-Gymnasium in Köln. 1964 Umzug nach Mainz. Umschulung in das Willigis-Gymnasium in Mainz. 1971 Abitur am Willigis-Gymnasium
Wehrersatzdienst:	Vom 1. Oktober 1971 bis 31. Januar 1973 als Operationshelfer in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik in Mainz
Studium:	WS 1971 und SS 1973 Publizistik und Soziologie in Mainz. 1975 Ausbildung in der Redaktion "Naturwissenschaft und Technik" beim Zweiten Deutschen Fernsehen. Seit WS 1973 Biochemie in Tübingen. 1976 Vordiplom-Prüfung in diesem Fach. 1980 Abschluß als Diplom-Biochemiker

Von Januar 1981 bis Juli 1984 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in den Forschungslaboratorien der Chirurgischen Universitätsklinik in Tübingen (Direktor Prof.Dr.Leo Koslowski) unter der Leitung von PD Dr.Dr.K.H.Schmidt.

Meine akademischen Lehrer waren

Bayer, Bessler, Betz, Bisswanger, Feine, Gönnenwein, Grell, Guglielmi, Häfelinger, Hagenmaier, Hanack, Hartter, Haselmann, Kallee, Krüger, Mauser, Mecke, Metzner, Mörike, Müller, Oberhammer, Pommer, Probst, Remmer, Rüdorff, Schmidt, Schwemmle, Voelter, Weber, Wegmann, Weitzel, Wendel, Weser, Zähner, Zeil